UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1949 N° 119

Essai d'identification et de dosage enzymatique de quelques esters de la choline au moyen des cholinestérases

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université

(Mention : PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement en Mars 1949

par

JACQUES DALBIS

Jury { MM. VINCENT *Président*
MM. BRUSTIER, DELAS, CAUJOLLE *Assesseurs.*
M. COUTURIER. *Suppléant*

IMPRIMERIE FORESTIÉ
23, Rue de la République, 23
MONTAUBAN

1949

Essai d'identification et de dosage enzymatique de quelques esters de la choline au moyen des cholinestérases

---

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

	MM.
Doyen	CALVET.
Assesseur	LEFEBVRE.
Doyens honoraires	BARDIER. GORSE.

Professeurs honoraires

MM. RISPAIL, MERIEL, RIBAUT, MAURIN, ARGAUD, LAFFORGUE, SERR. GARIPUY

PROFESSEURS

	MM.
Clinique de neurologie et psychiâtrie	RISER.
Clinique médicale	TAPIE. ROQUES.
Clinique obstétricale	GUILHEM.
Physiologie	SOULA.
Clinique chirurgicale et du cancer	DUCUING.
Physique biologique et médicale.	BUGNARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	NANTA
Chimie et toxicologie	BRUSTIER.
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL.
Clinique chirurgicale et gynécologique	LEFEBVRE.
Anatomie	VALLOIS. LAZORTHES
Histoire naturelle	DELAS.
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL (R).

	MM
Pharmacie	CAUJOLLE
Pathologie interne	MOREL.
Bactériologie — Hygiène — Médecine sociale	ANDRIEU.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE.
Clinique des maladies des voies urinaires	FABRE (P.)
Matière médicale	VINCENT.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MERIEL (P.)
Anatomie pathologique	FABRE (J.)
Clinique oto-rhino-laryngologique et maxillo-faciale	CALVET.
Clinique ophtalmologique	CALMETTES.
Chimie biologique	VALDIGUIE
Médecine légale et médecine du travail	PLANQUES.
Histologie et embryologie	BROUSSY.
Médecine sociale	BONHOURE.

PROFESSEURS SANS CHAIRES

Physiologie	M. BAISSET.
Anatomie	COULOUMA.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

	MM.
Anatomie	N
Histologie	BIMES ch. de t
Médecine	GADRAT. DARNAUD. GERAUD. DARDENNE. LAPORTE (J.)

	MM.
Chirurgie	N GRIMOUD. RIEUNAU. DIEULAFE. DAMBRIN (P.)
Ophtalmologie	DEODATI.
Physique médicale	MARQUES.
Chimie générale pharmaceutique.	BLANC.
Histoire naturelle pharmaceutique	Mme Dulucq Mathou
Odonto-Stomatologie	CADENAT.
Pharmacie	COUTURIER

COURS COMPLÉMENTAIRES

	MM.
Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	GUILHEM.
Cours d'anat. physiol. et pathol. élém. aux élèves sages-femmes.	GUILHEM.
Chimie pathologique	VALDIGUIE (P).
Chimie biologique	VALDIGUIE.
Chimie minérale	BLANC.
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT.
Dermatologie et syphiligraphie	BAZEX.
Législation pharmaceutique	BOUISSET.
Microbiologie	BOUISSET.

	MM.
Clinique de la tuberculose	MOREL (L.). P. DAMBRIN
Parasitologie	LASSERRE.
Botanique et cryptogamie	Mme Dulucq-Mathou
Chimie analytique	BLANC.
Hydrologie et géologie	ASTRE.
Anatomie médico-chirurgicale	THOMAS.
Médecine Sociale et du Travail.	BONHOURE.
Pharmacodynamie	BONHOURE.
Bactériologie et Hygiène	LAPORTE.
Urologie	LHEZ.
Ophtalmologie	DEODATI.
Neuro-chirurgie	LAZORTHES.
Clinique O. R. L.	CLAUX.

Secrétaire de la Faculté ..... ARGILAS.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération du 12 Mai 1891).

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1949 N° 119

Essai d'identification et de dosage enzymatique de quelques esters de la choline au moyen des cholinestérases

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université

(Mention : PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement en Mars 1949

par

JACQUES DALBIS

Jury { MM. VINCENT *Président*; BRUSTIER, DELAS, CAUJOLLE *Assesseurs.*; M. COUTURIER. *Suppléant* }

IMPRIMERIE FORESTIÉ
23, Rue de la République, 23
MONTAUBAN

1949

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MON PÈRE, A MA MÈRE

Ils ont toujours mis leur bonheur à réaliser le mien; qu'ils trouvent ici le faible témoignage de ma profonde affection et de mon infinie reconnaissance.

A TOUS LES MIENS

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR VINCENT

PROFESSEUR DE MATIÈRE MÉDICALE

qui m'a inspiré cette étude et prodigué ses conseils; ce m'est un devoir bien doux de lui exprimer ma déférente et vive gratitude pour sa constante sollicitude à mon égard et l'insigne honneur qu'il me fait en acceptant de présider cette thèse.

A MON JURY DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR BRUSTIER

PROFESSEUR DE CHIMIE ET DE TOXICOLOGIE

Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Toulouse

Officier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR DELAS

PROFESSEUR D'HISTOIRE NATURELLE

MONSIEUR LE PROFESSEUR CAUJOLLE

PROFESSEUR DE PHARMACIE

Pharmacien-Chef de l'Hôpital psychiâtrique Marchant

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ COUTURIER

HOMMAGE RESPECTUEUX.

A MES MAITRES

A MES AMIS

Essai d'identification et de dosage enzymatique de quelques esters de la choline au moyen des cholinestérases

INTRODUCTION

A côté des méthodes purement chimiques et physiques d'identification des nombreuses substances que l'on utilise en thérapeutique, il faut faire une place à des techniques d'ordre biochimique qui, pour être indirectes, peuvent, dans certains cas, revêtir un intérêt considérable. L'enzymologie représente une part importante de la biochimie. On connaît la grande diversité des ferments, on en sait aussi l'extraordinaire spécificité. Leur emploi dans l'analyse est plein de ressources. Ne devons-nous pas rappeler quels progrès Bourquelot a pu faire réaliser à la biochimie des hétérosides naturels par l'emploi de la banale émulsine des amandes ? Nous plaçant à un point de vue analogue, nous avons voulu rechercher dans quelle mesure l'étude analytique qualitative et quantitative des esters de la choline pourrait bénéficier de l'observation des effets des enzymes qui les hydrolysent, les cholinestérases.

Déjà en 1942 D. Vincent et Mlle A. Maugein (136) ont apporté une méthode de dosage biochimique de l'ésérine, inhibiteur puissant de la cholinestérase, par la mesure de l'intensité de ce pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la cholinestérase du sérum du Cheval. Une application pratique à la détection toxicologique des alcaloïdes inhibiteurs a été préconisée par D. Vincent et P. Beaujard (133). Sur la suggestion de M. le Professeur Vincent, nous avons pensé que l'étude de la cinétique fermentaire en présence des divers substrats, esters de la choline, pourrait éventuellement donner d'utiles renseignements d'ordre analytique pratique.

On sait que depuis quelques années la cholinestérase a subi un démembrement. D'abord considérée comme un ferment unique, attaquant spécifiquement les esters de la choline et en particulier l'acétylcholine dont le rôle est fondamental en physiologie nerveuse et neuromusculaire, la cholinestérase s'est révélée assez différente dans ses propriétés chimiques selon son origine. Il est apparu à divers chercheurs que la cholinestérase du sérum et celle des hématies ou du cerveau ne se comportent pas identiquement en fonction de la concentration de substrat (Alles et Hawes 1940) et qu'elles ne réagissent pas semblablement à diverses substances inhibitrices (E. Zeller et A. Bisseger 1943). Il appartint à l'école canadienne de Toronto (B. Mendel et ses élèves 1943) de démontrer péremptoirement la pluralité des cholinestérases en fonction des substrats auxquels elles s'attaquent et de distinguer : la cholinestérase vraie, spécifique (globules rouges, cerveau) et la « pseudocholinestérase » du plasma et du pancréas. On savait déjà que l'acétyl-β-méthylcholine ne subissait pas l'hydrolyse par la cholinestérase, alors que l'acétylcholine ou la propionylcholine étaient rapidement saponifiées. Il a été établi qu'en réalité la cholinestérase vraie est parfaitement capable d'hydrolyser l'acétyl-β-méthylcholine, alors que la cholinestérase du sérum ne peut le faire. Des différences ont été établies aussi à propos d'autres esters sur lesquels nous reviendrons par la suite. Tous ces éléments peuvent, semble-t-il, former une base à une méthode analytique que nous essayerons de mettre au point.

Plan d'Etude: Nous nous proposons dans ce travail de suivre le plan ci-après :

Chapitre premier. — Dans la première partie nous apporterons une revue générale de la question, nécessaire à la bonne compréhension de la suite de notre thèse :

a) Etude de la choline et de ses principaux esters;

b) Etude des cholinestérases.

Chapitre 2. — Dans la seconde partie seront rapportées nos expériences personnelles :

a) Exposé des techniques utilisées pour le dosage de la cholinestérase : méthode alcalimétrique et méthode manométrique;

b) Résultats concernant l'hydrolyse des divers esters de la choline en présence de diverses sources de cholinestérases.

Chapitre 3. — Essais d'application pratique concernant la diagnose des esters choliniques d'une part, leur titration quantitative d'autre part.

Conclusions.

Première Partie

Revue générale de la question

Dans cet exposé nous étudierons tour à tour la choline et les principaux de ses esters : l'acétylcholine, l'acétyl-β-méthylcholine, la propionylcholine, la benzoylcholine et la carbaminoylcholine, en insistant plus particulièrement sur les procédés chimiques et biologiques d'identification et de dosage. Les esters de la choline connus actuellement sont beaucoup plus nombreux (butyrylcholine, salicylcholine, phosphorylcholine, lécithines elles-mêmes, etc.). Nous ne prétendons donc pas en faire une étude complète et nous ne nous arrêterons qu'à ceux que nous avons personnellement expérimentés et qui d'ailleurs sont ceux que l'on utilise en thérapeutique.

CHAPITRE PREMIER

Choline et principaux Esters choliniques

LA CHOLINE

$OH — N(CH_3)_3 — CH_2 — CH_2OH$

Substance physiologique de la plus haute importance puisqu'elle est un constituant essentiel des lécithines (on sait que les lécithines sont des esters gras de l'ester glycérophosphorique de la choline), la choline entre encore dans la composition de nombreuses substances naturelles, de la sinalbine de la moutarde blanche, par exemple, qui est un ester sinapique de la choline. Signalée à l'état libre dans de nombreux végétaux (champignons, levure, graines, feuilles et racines de certaines plantes telles que la belladone et le lupin, le thé, la noix d'arec...). On la rencontre également dans le sérum sanguin (J. Teissier et A. Morel (124), Maxim et Vasiliu (94), le sperme, les tissus animaux les plus divers (cerveau, pancréas, poumon, foie, thyroïde, placenta. Chez les Invertébrés, Crustacés, Vers et certains Mollusques, on en trouve également. La choline est donc très répandue dans l'organisme animal et végétal. Du point de vue chimique on peut la considérer comme dérivant de la monoéthanolamine ou colamine, dont elle est l'hydrate d'ammonium quaternaire.

$CH_2OH - CH_2 - NH_2 \dashrightarrow CH_2OH - CH_2 - N(CH_3)_3 - OH$

Propriétés. — Masse sirupeuse hygroscopique difficilement cristallisable, incolore, à réaction fortement alcaline, la choline est très soluble dans l'eau et l'alcool et se carbonate facilement à l'air.

Traitée par les acides, elle produit aisément des sels bien cristallisés, stables, solubles dans l'eau.

Par oxydation, elle fournit successivement l'aldéhyde (pseudomuscarine) et l'acide correspondant (bétaïne).

Chauffée en solution aqueuse à l'ébullition, la choline se décompose en donnant de la triméthylamine, de l'oxyde d'éthylène et du glycol.

Procédés chimiques d'identification et de dosage. — La choline et ses dérivés se comportent comme des alcaloïdes et présentent des réactions caractéristiques identiques.

C'est ainsi qu'avec le réactif iodo-ioduré de Florence, elle donne un précipité de cristaux bruns de periodure :

$$I8[IN(CH_3)_3 - C_2H_4OH].$$

Le sel de Reinecke (chromi-diammonio-tétrasulfocyanure d'ammonium de formule $[Cr(NH_3)_2 (SCN)_4]NH_4, H_2O$ insolubilise la choline sous forme de Reineckate :

$$[Cr (NH_3)_2(SNC)_4] N(CH_3)_3-C_2H_4CH.$$

Avec le chlorure d'or elle donne un précipité de chloroaurate :

$$Cl - N(CH_3)_3 - C_2H_4OH, Cl_3Au \quad (P.\ F.\ 244°).$$

Avec le chlorure de platine elle donne un précipité de chloroplatinate :

$$[Cl - N(CH_3)_3 - C_2H_4OH]_2, Cl_4Pt \quad (P.\ F.\ 233°).$$

Avec le chlorure mercurique, elle donne un précipité de chloromercurate :

$$[Cl - N(CH_3)_3 - C_2H_4OH] , 6Cl_2Hg \quad (P.\ F.\ 242°).$$

Les acides silicotungstique et phosphotungstique donnent naissance à des silicotungstates :

$$12TuO_3, SiO_2 - [N(CH_3)_3 - C_2H_4OH]_4,$$

et à des phosphotungstates insolubles :

$$12TuO_3, PO_4 - [N(CH_3)_3]-[C_2H_4OH]_3.$$

Tous ces sels bien cristallisés peuvent permettre la caractérisation microchimique de la choline.

Quant aux procédés chimiques de dosage, ils découlent tout naturellement des procédés chimiques d'identification. C'est ainsi que l'on peut doser la choline soit à l'état de chloroaurate ou chloroplatinate, soit à l'état de périodure, soit de Reineckate, soit de phospho ou silicotungstate. Les méthodes de dosage étant les mêmes que celles utilisées pour le dosage de

l'acétylcholine, le détail et la critique en seront donnés au chapitre la concernant.

Méthodes biologiques de Dosage. — Ces méthodes, dont le principe est dû à Hunt et Taveau, mettent en œuvre le pouvoir hypotenseur de la choline qui, considérablement augmenté par acétylation, sert à caractériser cette base à l'état de traces infimes. C'est ainsi que l'on peut doser avec une approximation de 10 à 15% des quantités de choline de l'ordre de 1/10' de γ. Le procédé le plus sensible que nous étudierons plus onguement au chapitre suivant, résiderait dans l'emploi du muscle dorsal de sangsue sensibilisé par l'ésérine, qui se contracte déjà énergiquement au sein d'un sérum artificiel ayant une concentration en acétylcholine de l'ordre du milliardième.

Usage. — Vasodilatateur et excitant relativement faible du système parasympathique, la choline injectée, par voie intraveineuse, jouit de nettes propriétés hypotensives. Gautrelet lui attribue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine, en exerçant une action antagoniste de celle de l'adrénaline. Cette action est considérablement accrue par estérification de sa fonction alcool par les acides gras inférieurs et surtout dans le cas de l'acétylcholine.

En outre, la choline exercerait une action favorable dans les manifestations tuberculeuses, non pas en tant qu'antibacillaire spécifique, mais en influençant la résistance de l'organisme. Elle modifierait, d'après certains auteurs, le taux en cholestérol endogène et plus particulièrement le rapport de la cholestérolémie à la glycémie.

Enfin, de nombreux travaux américains parmi lesquels ceux de Best, Hersley et Huntzman (21), de Channon et Wilkinson (25), de Tucker et Eckstein (125) ont également révélé l'importance thérapeutique de la choline dans les affections hépatiques. C'est ainsi que la dégénérescence graisseuse du foie, provoquée expérimentalement chez le Rat par un régime riche en graisses et pauvre en protides, se trouve empêchée par l'administration quotidienne de 8 mgr. de choline. Cette dernière, selon Du Vigneaud et ses collaborateurs (12*bis*), jouerait un rôle particulièrement important comme agent donateur de groupements $-CH_3$ dans les phénomènes de transméthylation du métabolisme intermédiaire.

La choline est surtout utilisée en thérapeutique à l'état de sels (chlorure) et aussi à l'état d'ester.

L'ACÉTYLCHOLINE

$$OH - N(CH_3)_3 - CH_2 - CH_2 - O - CO - CH_3$$

Signalée dans de nombreux tissus animaux (moëlle, cerveau, dans le sang frais, et dans les divers organes des Mammifères, l'acétylcholine est également très répandue. Mais les divergences observées selon les conditions d'extraction, ainsi que l'écart important trouvé par les différents auteurs entre les chiffres extrêmes, leur ont fait admettre une libération d'acétylcholine à partir d'un complexe où elle était dissimulée, complexe dont la dislocation apparaît comme irrégulière dans des conditions identiques d'expérience et au sujet duquel nous n'avons pour l'instant pas grande précision.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus par ses nombreuses applications thérapeutiques placent l'acétylcholine parmi les substances suscitant le plus vif intérêt et les nombreux travaux qui lui ont été consacrés depuis une quarantaine d'années en font foi.

Propriétés. — Au point de vue chimique, l'acétylcholine, ester acétique de la choline est le triméthylacétoxyéthylammonium utilisé sous la forme de son chlorure de formule

$$Cl - N(CH_3)_3 - CH_2 - CH_2 - O - CO - CH_3.$$

Base forte, très soluble dans l'eau, l'acétylcholine a d'intenses propriétés hygroscopiques. Ses cristaux à l'air libre fixent rapidement l'eau de l'atmosphère et deviennent déliquescents (fait d'une importance primordiale pour la préparation des solutions étalons).

En solution aqueuse, l'ester acétique de la choline subit une hydrolyse totale. L'étude cinétique montre que cette hydrolyse obéit à une réaction de premier ordre. La constante de vitesse varie très rapidement avec le pH. C'est ainsi qu'en milieu fortement alcalin, l'hydrolyse est presque instantanée, alors qu'elle est beaucoup plus lente en milieu neutre et qu'en milieu acide (pH 3,9 selon Hoffmann), la stabilité des solutions est maxima et leur conservation presque indéfinie. L'acidité empê-

che à la fois l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine et son hydrolyse enzymatique par la cholinestérase. Signalons que pour empêcher toute hydrolyse, les solutions injectables utilisées en thérapeutique sont faites en milieu anhydre : mono et diacétine de la glycérine, monoacétate de glycol, diéthylène glycol ou lactate d'éthyle.

La constante de vitesse est pratiquement indépendante de la nature de l'anion : chlorure, perchlorate, zincibromure, manganochlorure (71).

Tout comme pour la choline, le sel de Reinecke insolubilise l'acétylcholine sous forme de Reineckate :

$[Cr(NH_3)_2(SCN)_4]N(CH_3)_3 - CH_2 - CH_2 - O - CO - CH_3$

Mais la cristallisation et le point de fusion diffèrent selon qu'il s'agit de l'alcool ou de son ester.

Le réactif iodoioduré donne un précipité de globules huileux brun foncé de périodure :

$$I_5[IN(CH_3)_3C_2H_4OCOCH_3],$$

ne présentent jamais l'aspect cristallin obtenu avec la choline elle-même (Cristaux de Florence).

Le chlorure mercurique, le chlorure de platine et le chlorure d'or donnent respectivement du chloromercurate :

$$Cl - N(CH_3)_3 - C_2H_4 - O - CO - CH_3], 6Cl_2 6HgCl_2,$$

du chloroplatinate :

$$[CH_3CO - O - CH_2 - CH_2 - N - (CH_3)_3Cl]_2PtCl_4,$$

du chloroaurate :

$$[CH_3CO - O - CH_2 - N(CH_3)_3Cl], AuCl_3.$$

Enfin les acides phosphotungstique et silicotungstique donnent des composés insolubles de phosphotungstate et silicotungstate.

Procédés chimiques d'Identification et de Dosage. — Ces procédés ne sont que l'application des réactions de précipitation de l'acétylcholine énoncées plus haut. Sur le liquide d'extraction désalbuminé et concentré, on fait agir les réactifs précipitants. Les précipités sont purifiés et recristallisés pour servir à l'identification et au dosage.

Pour l'identification, le procédé le plus en faveur que nous avons d'ailleurs utilisé dans nos recherches personnelles sur un procédé de diagnostic de la choline et des esters choliniques, est l'emploi du sel de Reinecke, grâce auquel on peut obtenir faci-

lement avec l'acétylcholine des cristaux en navette caractéristiques de P. F. = 173° ; alors que le Reineckate de choline fond à 250°.

Pour le dosage, E. Kahane et J. Lévy (72) préconisent l'emploi de phosphotungstate et silicotungstate et distinguent les sels obtenus avec l'acétylcholine de ceux fournis avec la choline, par la perte de poids observée à l'incinération.

Sharpe (119) et Roman (117), à partir du périodure, titrent l'iode par l'hyposulfite de soude après dissolution dans le chloroforme. Mais cette technique ne permet pas d'une part de doser séparément choline et acétylcholine et d'autre part une séparation facile du périodure.

Le procédé le plus en faveur est à n'en pas douter celui de Kapfhammer et Bischoff (75). Après extraction alcoolique et trichloracétique, a lieu une première séparation de la choline et de ses esters par une solution saturée de sel de Reinecke, suivie de lavages à l'eau glacée, à l'alcool absolu et à l'éther. Le résidu est séché dans le vide et repris par un mélange d'acétone et d'eau à parties égales. Du sulfate d'argent à 6 p. 1000 ajouté, précipite l'acide de Reinecke à l'état de Reineckate d'argent qu'on sépare par filtration. L'addition de $BaCl_2$ précipite Ba, SO_4 et Ag. Le liquide clair est concentré, traité par une solution saturée de chlorure d'or neutralisée au rouge Congo par CO_3NaH. Il se forme un précipité qu'on laisse cristalliser à la glacière, qu'on purifie par recristallisation, qu'on sèche, pèse et sur lequel on fait des réactions d'identification.

Kahane et Coupechoux (70) ont proposé de terminer le dosage à partir du Reineckate par bromométrie : le précipité est traité à l'ébullition par la soude diluée, acidifié par HCl et additionné d'un excès de solution titrée de BrO_3K - KBr. L'excès de brome est déterminé par addition de KI et titrage par l'hyposulfite de soude.

Kahane et Lévy (73) ont mis au point une méthode de dosage alcalimétrique par saponification de l'acétylcholine à l'ébullition en présence d'un excès de soude qu'on titre en retour.

Critique. — Tous ces procédés ont l'inconvénient de nécessiter une grande quantité de matières à analyser et réclament de plus un temps relativement long. Seule la dernière méthode est simple et rapide, mais n'échappe pas à la première critique.

Etant donné la très faible teneur des organes en acétylcholine, on emploie le plus souvent des méthodes biologiques.

Propriétés et Méthodes de Dosage biologiques. — Suivant la classification adoptée par Dale dès 1914 (29), l'acétylcholine est douée de propriétés biologiques à type muscarinique et nicotinique.

Au type muscarinique il faut rattacher son action de ralentissement sur le cœur, dont, en même temps, elle diminue l'amplitude tandis qu'elle abaisse la pression artérielle. Cette action, qui est déterminée par de faibles doses d'acétylcholine, est abolie par l'atropine. De même, elle augmente le tonus de l'intestin et celui de l'utérus, effet qui est également empêché par l'atropinisation.

Au type nicotinique, il faut rattacher sa propriété de provoquer la contracture du muscle volontaire énervé des Mammifères, du muscle droit de l'abdomen de la Grenouille et du muscle de Sangsue énervé.

Cœur isolé. — L'effet inhibiteur de l'acétylcholine sur le cœur isolé de la Grenouille a été le premier test biologique employé pour sa caractérisation. Par la suite, bien des expérimentateurs l'adoptèrent, notamment Führer (52) et Lœwi (82) qui s'en servit pour ses remarquables expériences de transmission humorale de l'effet vagal, Straub qui mit au point une technique courante aujourd'hui, Halpern et Corteggiani (64) en 1938, selon qui le cœur de Grenouille répond par une réaction inotrope négative dès que l'acétylcholine atteint une concentration de 1.10^{-8} à 1.10^{-9}.

Jullien, Vincent (69), Vuillet et Bouchet (1939), dans des expériences sur le cœur d'Escargot, ont fait observer que ce dernier était nettement plus sensible à l'acétylcholine quand la drogue agit par voie interne. Les auteurs ont montré que le premier arrêt du cœur (2-3 minutes environ) monté toujours d'après la méthode de Straub, est obtenue par une concentration égale à 1 p. 100.000. En milieu ésériné on observe un arrêt du cœur pour une concentration d'acétylcholine égale à 1 p. 100 millions.

Pression sanguine. — La pression sanguine des divers animaux auxquels on a préalablement injecté une petite dose d'ésérine (Chat, Chien, Lapin), permet de doser 0,03 γ à 0,3 γ

d'acétylcholine par kg., sans dépasser 15% d'erreur [J. Lévy et Olszycka (80)].

Intestin isolé. — La technique a été mise au point par Guggenheim et Löffler en 1916 (61) sur l'intestin isolé de Cobaye qui répond par une élévation de tonus à des concentrations d'acétylcholine de l'ordre de 1.10^{-9}. D'autres auteurs comme Kahlson (74) et Bernheim (20) préférèrent l'intestin de Rat.

Utérus isolé. — L'utérus isolé de Cobaye répond également à l'action de l'acétylcholine. Cette méthode a été mise au point par Webster (140), l'utérus répondant par une contracture lorsque la concentration du bain en acétylcholine atteint 1.10^{-6} à 1.10^{-7}, mais Feldberg a attiré l'attention sur le manque de spécificité de ce réactif sur lequel l'histamine est active.

Poumon de Grenouille. — Ce procédé indique en 1939 par Dijkstra et Noyons (39) a été rendu quantitatif en 1941 par Martin Corsten (28). La sensibilité des fibres musculaires alvéolaires est de 1.10^{-7}, mais, après addition d'ésérine à 1.10^{-5}, sa sensibilité atteint 1.10^{-20}, chiffre vraiment extraordinaire, puisqu'il dépasserait la dixième dilution centésimale Hahnemann des homéopathes (d'après Cheymol).

Muscle gastrocnémien énervé du Chat. — Après section de leurs nerfs moteurs, les muscles de Mammifères deviennent sensibles à l'action de l'acétylcholine ainsi que l'ont montré Frank (46), Frank, Nothmann et Hirsch-Kaufmann (48), Dale et Gasser (35), mais cette méthode, d'une assez grande complication, n'est jamais utilisée.

Muscle rectus abdominis de Grenouille. — Beaucoup plus intéressant est l'effet contracturant de l'acétylcholine sur ce muscle isolé ésériné. Chang et Gaddum (24) mirent ainsi au point une méthode pratique d'une très bonne spécificité, mais d'une sensibilité relativement faible, puisqu'elle ne permet de déceler l'acétylcholine qu'à une concentration de 1.10^{-7} et encore *Rana temporaria* s'avère moins sensible que *Rana esculenta* habituellement employée.

Muscle dorsal de Sangsue. — La très grande sensibilité à l'acétylcholine du muscle dorsal de Sangsue ésériné signalée par Fühner (150) a été utilisée par Minz en 1932 (96) qui mit

au point une technique de dosage biologique de l'acétylcholine très utilisée aujourd'hui. On considère le muscle de Sangsue comme spécifique de l'acétylcholine, mais il est nécessaire de satisfaire aux conditions suivantes pour pouvoir affirmer qu'on se trouve en présence de la « substance équivalente de l'acétylcholine » que l'on peut, grâce à ce réactif, déceler dans les organes :

1° L'effet doit être augmenté dans de grandes proportions par l'ésérine.

2° L'activité doit disparaître rapidement lorsqu'on ajoute du sérum à l'extrait neutralisé.

3° De même, le passage en milieu fortement alcalin pendant environ 10 minutes à la température ordinaire doit en détruire l'effet.

Après action de l'ésérine (Ringer ésériné 1/100.000) pendant 20 à 30 minutes, les essais révèlent l'extraordinaire sensibilité de cette méthode, puisque, d'après Minz, le muscle ésériné peut répondre par une contraction appréciable à une concentration de 1.10^{-9} et même 1.10^{-10} d'acétylcholine.

Telles sont donc les principales des nombreuses méthodes mettant à profit la réaction de certains organes à des quantités très minimes d'acétylcholine pour en permettre le dosage, aucune méthode chimique n'étant assez sensible pour être appliquée avec succès à l'étude des doses d'acétylcholine mises en jeu dans la transmission de l'influx nerveux.

C'est ainsi que par de nombreux travaux microanalytiques, la répartition de l'acétylcholine a pu être établie (Chang et Gaddum (24), Bacq (11, 12, 13), Minz (94), Vincent (129, 130), Jullien (68), Halpern et Corteggiani (64), non seulement chez les Mammifères, mais aussi chez les Invertébrés (Mollusques, Crustacés, Vers). C'est par de telles méthodes qu'a aussi pu être démontré le rôle biologique éminent que l'on reconnaît à l'acétylcholine dans les processus de médiation cholinergique du système nerveux [Dale et Feldberg (52, 53, 54), Bacq (11, 12, 13)].

Usage. — Introduite en thérapeutique par Villaret et Justin Besançon (130), l'acétylcholine a une action parallèle à la choline, mais beaucoup plus importante. Son effet se manifeste

surtout par une vasodilatation artériolaire. Aussi préconise-t-on son emploi :

— dans le traitement des accidents de l'hypertension artérielle ;

— dans celui des troubles vasculaires : affections vaso-motrices, périphériques, spasmes artériels, syndrôme de Raynaud, artérites, ictus hémiplégiques ;

— dans celui des hypovagotonies et des deséquilibres neuro-végétatifs.

Dans le traitement de l'épilepsie, certains admettent que l'acétylcholine réussit là où le gardénal échoue ; elle est aussi indiquée dans le traitement de l'hypochlorhydrie, de la migraine ophtalmique dont elle serait le remède spécifique.

Très stable dans les milieux organiques non hydrolysants, le chlorure d'acétylcholine est utilisé en solution dans le diéthylène glycol et son ester butylique ou butylcarbinol (acécoline solution).

Associée à l'yohimbine, l'acétylcholine provoque une hypotension très prolongée ; cette action hypotensive est encore renforcée par la spartéine et le chloral. On l'associe également au camphre. Danielopolu attribue à l'acétylcholine une action favorable sur la trophicité des tissus.

A l'extérieur on la prescrit en application locale dans le cas des ulcères variqueux et des plaies atones.

L'ACÉTYL-BÉTAMÉTHYL-CHOLINE

$$HO — N(CH_3)_3 — CH_2 — CH(CH_3) — O — CO — CH_3$$

A la suite des recherches sur les homologues supérieurs de la choline, en particulier des méthylcholines, les travaux de Major et Cline ont fait disparaître une confusion qui, durant une vingtaine d'années, a existé entre les différentes méthylcholines. On connaît en effet trois isomères :

α-méthylcholine : $Cl - N(CH_3)_3 - CH(CH_3) - CH_2OH$

β-méthylcholine : $Cl - N(CH_3)_3 - CH_2 - CH(CH_3) - OH$

γ-méthylcholine ou homocholine :

$$Cl - N(CH_3)_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2OH$$

qui ont été confondus entre eux, en raison du fait que, dans

l'action de la triméthylamine sur les deux dérivés halogénés :

$$CH_3 - CHOH - CH_2Cl$$

et $CH_3 - CHCl - CH_2OH$,

on obtient presque uniquement de la β-méthylcholine, alors qu'on pensait préparer ainsi deux isomères différents. L'oxydation permanganique des méthylcholines α et β permet leur identification et leur dosage sommaire.

Comme dans le cas de la choline, l'acétylation renforce considérablement l'action de la base initiale. L'acétyl-β-méthylcholine a une action comparable à celle de l'acétylcholine, mais étant notablement plus résistante que l'acétylcholine à la destruction hydrolytique par le sang, les conséquences de sa plus grande stabilité sont une plus grande efficacité après injection sous-cutanée et la possibilité d'une action hypotensive par voie buccale comme l'ont démontré M. Villaret, Justin-Besançon et Cachera (130).

Propriétés et Méthodes chimiques d'Identification et de Dosage. — Sel blanc, très hygroscopique, se colorant à la lumière, le bromure d'acétyl-β-méthylcholine est très soluble dans l'eau et l'alcool en donnant des solutions qui s'hydrolysent rapidement.

Ses méthodes chimiques d'identification et de dosage sont les mêmes que celles utilisées pour l'acétylcholine.

Usage. — Le bromure d'acétyl-β-méthylcholine, de même que le chlorure, injecté par voie intraveineuse possède un effet comparable à celui de l'acétylcholine, mais beaucoup plus intense : il correspondrait à 20 fois celui de cette dernière. En outre, il a l'avantage d'agir lorsqu'il est administré par voie buccale. Toutefois, dans ce cas, c'est l'effet vasodilateur qui prédomine sans que le pouls soit influencé. Au contraire, en injection sous-cutanée, il affecte tout d'abord la pression sanguine, en provoquant chez le patient des sueurs, de la salivation et des nausées; son action est rapide et passagère.

Son action sur le parasympathique ou système vague (action muscarinique) est très puissante, alors que l'action nicotinique, est plus faible. Cette substance agit comme antagoniste de l'adrénaline et de l'éphédrine, en ce qui concerne le pouvoir mydriatique et hypotenseur.

BENZOYLCHOLINE

$$OH - N(CH_3)_3 - CH_2 - CH_2 - O - CO - C_6H_5$$

et PROPIONYLCHOLINE

$$OH - N(CH_3)_3 - CH_2 - CH_2 - O - CO - CH_2 - CH_3$$

Parmi les esters choliniques que nous avons étudiés, la benzoylcholine et la propionylcholine sont ceux sur lesquels nous avons recueilli le moins de renseignements.

Mis à part les points de fusion qui peuvent servir au contrôle sommaire des produits que nous avons expérimentés, nous n'avons guère trouvé de documents susceptibles d'être utilisés pour nos recherches.

Le chlorure de benzoylcholine, sel blanc, beaucoup moins hygroscopique que le chlorure d'acétylcholine, est très peu soluble dans l'eau froide,, guère plus soluble dans l'eau chaude (1 p. 1000 à 38°). Le perchlorate, légèrement coloré en beige clair est légèrement plus soluble dans l'eau que le chlorure. D'après Erich Baer (16), les points de fusion sont respectivement de 204-205° pour le chlorure, 187-188° pour le chloroaurate, 234° pour le chloroplatinate avec décomposition.

Le chlorure de propionylcholine, sel blanc, également beaucoup moins hygroscopique que le chlorure d'acétylcholine, plus soluble dans l'eau que le chlorure de benzoylcholine (20 p. 1000 à 38°) est environ trois fois moins soluble que le chlorure d'acétylcholine. D'après Erich Baer, le chlorure de propionylcholine fond à 110°.

Au point de vue physiologique, Simonart assure que l'ester propionique a des propriétés nicotiniques moins accentuées que l'acétylcholine. Son action sur la pression sanguine est an contraire plus puissante que celle de l'acétylcholine. Mais sur le muscle énervé la propionylcholine est à peu près aussi active que l'acétylcholine.

Kahane et Lévy (13), étudiant l'action du sang sur quelques ammoniums quaternaires à fonction ester, ont constaté que la propionylcholine était hydrolysée par le sang et le sérum et que pour cet ester l'animal éséríné était sensibilisé. Ils constatèrent également que la benzoylcholine était hydrolysée par le sérum,

moins vite toutefois que l'acétylcholine, mais que son activité n'était pas augmentée par l'ésérine chez le Chien.

M. Villaret, L. Justin-Besançon et R. Cachera (130), étudiant les propriétés hypotensives de quelques esters choliniques constatèrent que la benzoylcholine n'a pas de propriétés hypotensives, alors que la propionylcholine possède un effet 100 fois supérieur à celui de la choline.

CARBAMINOYLCHOLINE

$$OH — N(CH_3)_3 — CH_2 — CH2 — O — CO — NH_2$$

Propriétés. — Poudre blanche, inodore, soluble dans son poids d'eau, dans 10 parties d'alcool méthylique et dans 50 parties d'alcool éthylique, la carbaminoylcholine a des solutions aqueuses neutres au tournesol et stables à l'ébullition. Son point de fusion varie entre 202 et 203° et elle fond en se décomposant. Soumise à chaud à l'action de la lessive de soude, la carbaminoylcholine est décomposée avec dégagement de triméthylamine.

L'addition à une solution de 0 gr. 10 de carbaminoylcholine dans 2 cm^3 d'alcool méthylique, d'une liqueur de chlorure d'iode jusqu'à teinte jaune brun, puis d'un excès d'éther jusqu'à apparition d'un trouble laiteux, détermine la formation d'un précipité en petites aiguilles, constitué par un chloroiodure. Celui-ci, essoré et séché, fond à 101-103°.

La solution aqueuse de cet ester, acidifiée par l'acide azotique, précipite par l'azotate d'argent.

La pureté du composé peut être déduite d'un dosage de chlore par le procédé Charpentier-Vohlard.

Usages. — Excitant du système nerveux parasympathique comparable à l'acétylcholine, mais exerçant une action hypotensive plus marquée, la carbaminoylcholine, ou doryl, est environ 80 fois plus toxique. A la dose de 1/100e de mgr. en injection intraveineuse, elle excite le centre respiratoire et provoque un abaissement notable de la tension artérielle avec diminution de la fréquence du pouls et augmentation de son volume. A doses plus élevées, elle déprime le centre respiratoire, accroît les sécrétions gastriques et intestinales et active les mouvements péristaltiques de l'estomac et de l'intestin ainsi que les contrac-

tions utérines. Elle agirait même administrée par voie buccale. On note une augmentation de la sécrétion gastrique, de la chlorhydrie et de l'excrétion de mucus.

En instil'ation, elle intervient comme myotique, mais se détruit rapidement au contact des tissus intraoculaires. Son emploi est indiqué dans le cas d'hypertension artérielle, d'éclampsie, de tachycardie, de glaucome et dans le traitement de l'ozène.

En médecine vétérinaire, la carbaminoylcholine ou lentine est préconisée dans le traitement de la colique des chevaux, de la constipation et du météorisme des bovidés. On l'emploie aussi pour le traitement par voie orale de la distomatose du mouton.

CHAPITRE DEUXIÈME

LES CHOLINESTÉRASES

Parallèlement aux travaux sur l'acétylcholine, se poursuivait l'étude du ferment dont la propriété essentielle était d'hydrolyser cet ester et par suite de l'inactiver : à côté de l'acétylcholine, il fallait déceler l'activité fermentaire cholinestérasique.

HISTORIQUE. — Dale, dès 1914, suggère la présence dans le sang d'un enzyme intervenant dans la destruction de l'acétylcholine. En 1925 Abderhalden et Paffrath (1) montrent l'existence d'un tel enzyme dans le petit intestin du Cheval et du Porc. Lœwi et Navratil (86) démontrent un an plus tard l'existence d'un enzyme inactivant, le « vagusstoff », dans les extraits préparés à partir de muscle cardiaque et ils interprètent cette inactivation comme étant dûe à l'hydrolyse d'un ester cholinique instable, hydrolyse fermentaire, inhibée par la physostigmine : cet ester n'est autre que l'acétylcholine. A peu près à la même époque, Plattner (109) remarque le grand effet hydrolysant du sang sur l'acétylcholine, et en 1928 (110) il explique cet effet inactivant du sang comme une catalyse non spécifique de surface par les érythrocytes.

Clark, en 1927 (26), confirme les conclusions de Lœwi et Navratil (87), à savoir que la destruction de l'acétylcholine par le tissu du cœur est dûe à un enzyme. Engelhardt et Lœwi en 1930 (43) expliquent l'action du sang sur l'acétylcholine, en suggérant l'existence d'une estérase complètement inhibée par des quantiés minimes de physostigmine, tandis que Matthes (1930) (93) montre que les conditions de l'inactivation de l'acétylcholine correspondent à l'action d'une estérase. Plattner et Hintner, en 1930 (112) également, furent les premiers à montrer que l'enzyme se trouve dans presque tous les tissus animaux.

En 1932, Stedman, Stedman et Easson (122) préparent à partir du serum de cheval, un enzyme que l'on pensait être une estérase spécifique vis-à-vis de l'acétylcholine; ils l'appelèrent la « choline-estérase », et ils montrèrent qu'elle était capable de décomposer d'autres esters choliniques. Stedman, Stedman et White en 1933 (123) comparent les activités cholinestérasiques des sérums sanguins provenant d'espèces différentes. Des recherches plus récentes ne soutiennent pas le point de vue que l'enzyme préparé par Stedman soit une cholinestérase spécifique. Le problème de la spécificité de la cholinestérase était dès lors posé; nous le discuterons plus loin.

Répartition. — L'identification du ferment étant faite, on s'est préoccupé d'en connaître la répartition tant dans le règne animal que végétal.

Chez les végétaux, aucune des très nombreuses espèces étudiées par Oury et Bacq (107) ne manifeste une activité cholinestérasique. En particulier, la cholinestérase ne peut être décelée chez les Cryptogames : amanites, ergot de seigle, levures.

Tout différents ont été les résultats obtenus dans le règne animal. Chez les Vertébrés, la cholinestérase paraît exister dans tous les organes : telle est la conclusion dégagée par les nombreux travaux de Chang et Gaddum (24), Kahane et Lévy (72), Bacq (11-12-13).

Plattner et Hintner (112-113), affirmant l'existence d'une relation grossière entre l'activité cholinestérasique et « l'équivalent acétylcholine » des tissus, ont montré qu'à des tissus riches en esters de la choline correspondait généralement un pouvoir estérasique élevé. Mais cette règle est loin d'être absolue. Certains organes et certaines humeurs, en particulier le sang et le foie, très pauvres en acétylcholine, se sont révélés très actifs au point de vue cholinestérasique. Marnay (89) décèle également un très faible pouvoir cholinestérasique dans la rate de Cheval qui, d'après Dudley (40) et différents auteurs, se trouve très riche en acétylcholine. Cependant Nachmansohn (102-103), dans ses importants travaux concernant la répartition de la cholinestérase dans le système nerveux central, a en partie vérifié les résultats de Plattner et Hintner (112-113).

Dans le cas du cerveau humain, du Chien, du Bœuf et du Lapin, la concentration de l'enzyme ne s'est pas toujours montrée la même. Elle varie dans les différents centres, suivant leur

richesse en synapses. Les valeurs obtenues pour les différentes régions sont différentes d'une espèce à l'autre, mais sont remarquablement constantes dans une même région, pour une même espèce.

Utilisant comme unité la quantité de cholinestérase qui correspond au nombre de mgr. d'acétylcholine hydrolysés en 60 minutes par 100 mgr. de tissus frais, Nachmansohn a dressé un tableau comparatif de l'activité cholinestérasique des organes du système nerveux chez plusieurs espèces. Les résultats trouvés montrent la disproportion de l'activité cholinestérasique entre la substance blanche et la substance grise en faveur de cette dernière, seule à contenir les corps des cellules nerveuses et les synapses. Les expériences qu'il a faites sur la chaîne sympathique du Chien accusent une activité cholinestérasique des ganglions 2 à 4 fois plus grande que celle des connectifs.

Dans le muscle, la plaque motrice est plus active que la fibre musculaire. Dans toutes les fibres nerveuses, fibres motrices et sensitives, nerf optique et sympathique, la concentration de l'enzyme s'est montrée assez élevée et s'accroît encore sensiblement au niveau des synapses.

Etudiant enfin les tissus d'embryon de Poulet et de Cobaye, Nachmansohn a démontré qu'une relation existait entre la concentration de la cholinestérase et sa fonction pendant le développement embryonnaire. La concentration en cholinestérase n'est élevée que lorsque l'influx nerveux commence à être transmis, c'est-à-dire au début du fonctionnement des synapses.

Chez les Invertébrés, l'étude de la répartition de l'activité cholinestérasique a été poursuivie par Ammon (5), Gautret et Halpern (57), Bacq (11-12-13), Nachmansohn (102-103) et Vincent (131-132).

Chez les Mollusques, on observe que l'activité cholinestérasique est très faible chez les Céphalopodes lamellibranches et chez les Gastéropodes opistobranches. L'activité est notable au contraire chez les Gastéropodes pulmonés et surtout les prosobranches.

Vincent et Jullien (135) signalent une activité particulièrement élevée chez « *Murex* » et « *Helix pomatia* » en soulignant son parallélisme étroit avec l'équivalent acétylcholinique étudié simultanément, en particulier dans le myocarde de ces mêmes animaux.

Chez les Crustacés, D. Vincent trouve une activité cholinestérasique nette chez *Astacus* et *Palinurus* et Koschtojanz en 1938 signale spécialement *Daphnia* et *Cyclops*.

Nachmansohn, dans la chaîne nerveuse du Homard (système nerveux central de l'animal), décèle une concentration importante de l'enzyme autour des synapses.

Chez les Echinodermes *(Holothuria)*, Bacq et Nachmansohn notent que l'activité cholinestérasique est du même ordre que chez les Crustacés et les Mollusques.

Rappelons que chez les Vers (Sangsue) existe une cholinestérase très active que l'on inhibe par l'ésérine pour pratiquer le dosage biologique de l'acétylcholine par la méthode de Fühner (51-52) et Minz (96).

Le Système acétylcholine-cholinestérase et la Transmission de l'Influx nerveux. — Après avoir été mise en évidence d'une manière indiscutable, la cholinestérase a soulevé de nombreuses discussions lorsqu'il a fallu déterminer le rôle du système acétylcholine-cholinestérase et son mode d'action.

Les recherches de Dale (29 à 35), Loewi (82 à 87) et de leurs élèves ont montré que, lors d'une excitation nerveuse, il apparaît aux synapses (nerveuses et neuroeffectives) une certaine quantité d'acétylcholine. Les multiples travaux qui ont suivi ces découvertes capitales ont permis de prouver que la transmission des influx nerveux, tant dans les synapses centrales que périphériques, se fait grâce aux médiateurs chimiques, l'acétylcholine et la sympathine. Le mécanisme de transmission cholinergique est général. Il intéresse le système nerveux central, les nerfs moteurs volontaires, le pneumogastrique moteur et sécrétoire et les fibres sympathiques préganglionnaires. La transmission adrénergique forme l'exception et ne se trouve que dans les fibres sympathiques post-ganglionnaires. D'après Dale, elle serait secondaire à la transmission cholinergique.

Le nerf excité émet de l'acétylcholine à sa terminaison, et ce médiateur chimique est responsable de la propagation des stimulus aux fibres nerveuses post-sympathiques ou aux effecteurs organiques. Mais pour que la stimulation nerveuse soit unique, pour que chaque excitation n'entraîne qu'une seule réponse, il faut que pendant la phase réfractaire, l'acétylcholine produite soit inactivée très rapidement. Ce rôle est dévolu à la cholinestérase qui décompose l'acétylcholine en choline et acide acé-

tique physiologiquement inactifs. Cette cholinestérase est suffisante [d'après les travaux de Nachmansohn, Feldberg, Vertiainen (127) et Armstrong (1945) (7)] pour assurer la saponification de toute l'acétylcholine émise pendant la phase réfractaire, fait qui lève la principale objection de Eccles (1937) (42) à la transmission humorale des influx nerveux.

Cependant, les électrophysiologistes n'ont accordé jusqu'à présent qu'une importance secondaire aux médiateurs chimiques. Pour ces chercheurs, le système acétylcholine-cholinestérase ne servirait qu'à créer des conditions favorables (états de dépolarisation) à la transmission électrique des influx nerveux. Gérard (1942) conclut ainsi sa revue annuelle sur les progrès de l'électrophysiologie : « Il semble que la vue suivante gagne du terrain : le groupe d'agents acétylcholiniques, ainsi que l'ion K^+, servent à modifier la réactivité des muscles à l'agent transmetteur ; ce ne sont pas les transmetteurs eux-mêmes ».

Cependant Nachmansohn, étudiant la production de l'électricité par l'organe électrique de la Torpille, a pu faire la constatation intéressante que l'activité du système acétylcholine-cholinestérase fait naître des différences de potentiel importantes. Un processus purement chimique provoquerait ainsi, *in vivo*, la naissance d'une grande énergie électrique. Est-ce là la solution du problème ? Il est fort possible que dans les nerfs et les synapses centrales, les différences de potentiel se produisent ainsi par l'activité du système acétylcholine-cholinestérase et permettent la transmission électrique des influx nerveux.

Quoi qu'il en soit, il nous apparaît comme certain que l'action de l'acétylcholine et de son ferment inactivateur jouent un rôle de premier plan dans la transmission des influx nerveux. Si le rôle de l'acétylcholine est de transmettre des influx nerveux, celui de la cholinestérase est de limiter dans le temps et dans l'espace l'action de son médiateur chimique. La cholinestérase est donc essentiellement un ferment de défense. C'est une barrière contre l'inondation de l'organisme par l'acétylcholine dont la puissante activité pharmacodynamique, si elle se prolongeait, serait incompatible avec la vie.

Le mécanisme d'action de la cholinestérase, qui se ramène à une hydrolyse, paraît assez simple et il ne semble pas qu'on puisse retenir à l'actif de la cholinestérase seule, une démolition plus poussée du groupe choline, ainsi que le suggéraient

Villaret, J. Besançon et Cachera (130), ni une inactivation de l'acétylcholine par passage à un état dissimulé. Kahane, qui avait pensé à la possibilité de ce dernier mécanisme, a dû l'abandonner après des expériences précises.

Il est probable pourtant que son rôle dans les tissus ne se limite pas à l'hydrolyse pure et simple de l'acétylcholine afin d'empêcher la diffusion et la persistance de ce corps actif, après chaque phénomène de transmission chimique : il n'est pas impossible qu'elle ait, par reversibilité de son action, une fonction synthétisante dans certaines conditions, comme Abderhalden et Paffrath, Ammon et Kwiatkowski l'ont admis pour le cas de l'intestin. Toutefois il importe de remarquer qu'un enzyme spécial, la choline-acétylase, a été identifié par Nachmansohn et Machado (105), dont la fonction est la resynthèse de l'acétylcholine. Cet enzyme, différent de la cholinestérase, existe dans les centres nerveux.

Il faut remarquer également que les données précédentes ne s'appliquent avec rigueur qu'en ce qui concerne le rôle de la cholinestérase du système nerveux. Celle du sérum s'en écarte par bien des points et paraît indépendante de la première. D'une part, les modifications pathologiques ou celles obtenues exérimentalement sous l'influence d'inhibiteurs tendent à prouver, de même que l'absence de cholinestérase dans le sérum de certains animaux, que la cholinestérase sérique est pratiquement sans rapport avec le fonctionnement nerveux et pourrait avoir un rôle métabolique beaucoup plus obscur (Vincent). Alles et Hawes (4), Richter et Croft (115), Mendel, Mundell et Rudney (98) ont montré qu'elles n'ont pas les mêmes propriétés de spécificité, si bien que la cholinestérase du sérum, non strictement spécifique des esters de la choline, est nommée encore « pseudo-cholinestérase », par opposition à la cholinestérase spécifique des érythrocytes ou du système nerveux.

Spécificité et différents Types de Cholinestérase. — Est-ce à dire qu'il existe plusieurs cholinestérases ? Les résultats des travaux de nombreux chercheurs semblent devoir donner une réponse affirmative à ce problème.

Lorsqu'on étudie en effet les cholinestérases sérique, globulaire, hépatique et cérébrale, on est frappé par leur différence de comportement en présence des différents effecteurs ou envers les différentes concentrations en substrats.

En 1933, Stedman, Stedman et White (123), dans une étude des variations de la cholinestérase du sérum des animaux de différentes espèces, notaient déjà l'absence de relations quelconques entre la vitesse d'hydrolyse des divers substrats. Ces auteurs employaient l'acétylcholine, la butyrylcholine, qui est hydrolysée environ deux fois plus rapidement, le méthylbutyrate et la tributyrine, ce dernier substrat, hydrolysé par une lipase dont l'activité se traduit par une augmentation de la tension superficielle ; ils concluaient à la présence d'au moins deux estérases voisines dans le sérum : une cholinestérase, une estérase ou lipase.

L'effet d'hydrolyse de l'acétylcholine par les érythrocytes étant lui aussi connu depuis longtemps, la question connexe soulevée fut de savoir si les cholinestérases des érythrocytes et du sérum étaient les mêmes. En 1940, Alles et Hawes étudiaient expérimentalement ce problème pour la première fois sur du sang humain. Ces auteurs montraient que l'enzyme du sérum et celui des érythrocytes sont distincts. Cette conclusion était basée sur les différences observées en fonction de la concentration en ions H^+, du ClNa et du substrat. Alles et Hawes observaient que l'excès d'acétylcholine diminue l'activité de la cholinestérase des globules, ce qui n'était pas le cas avec la cholinestérase du sérum. L'acétyl-β-méthylcholine était décomposée par les globules dans les mêmes proportions que l'acétylcholine, tandis que le sérum ne l'hydrolysait que très légèrement. Ces observations ont été confirmées récemment et considérablement étendues par différents groupes d'investigateurs.

Deux ans plus tard, en 1942, quelques remarques à propos d'études faites sur les inhibiteurs de la cholinestérase par D. Vincent et Mademoiselle Séro (139) et au cours desquelles ils avaient observé une discordance de l'effet inhibiteur de préparations de « *Tabernanthe iboga* » par rapport aux différentes sources de cholinestérase, les incitèrent à poser la question de la pluralité des cholinestérases.

La même année, Richter et Croft (115) montraient que l'hydrolyse du butyrate de méthyle et de la tributyrine par du sérum humain est dûe surtout à la cholinestérase, confirmant ainsi une première observation faite par Vahlquist en 1935 (126). On dit que la cholinestérase des érythrocytes est différente de

celle du sérum en ce sens qu'elle a une plus grande spécificité envers les esters de la choline. De plus, les deux enzymes se conduisent différemment vis-à-vis de certaines substances.

Mendel et Rudney (1943 (99) étudièrent des préparations très pures d'enzymes et trouvèrent que la cholinestérase du sérum sanguin et des tissus de certains animaux est une cholinestérase non spécifique qui hydrolyse non seulement les esters de choline, mais aussi une variété d'esters non choliniques : ils ont appelés l'enzyme non spécifique « une pseudo-cholinestérase ».

Une observation identique à celle de Alles et Hawes fut que la cholinestérase non spécifique du sérum sanguin présente une activité maxima pour de hautes concentrations d'acétylcholine (1 mgr. par cm^3) et déploie une activité décroissante avec des concentrations décroissantes de substrat. La cholinestérase spécifique des cellules du cerveau et du sang, au contraire, présente une activité maximum pour de faibles concentrations d'acétylcholine (1 mgr. par 100 cm^3 et au-dessous) et déploie une activité décroissante avec des concentrations croissantes de substrat.

De plus, en se basant non plus sur l'origine, mais plutôt sur la spécificité, Mendel et Rudney (98), Mendel et Mundell (99), Mundell et Rudney (101) rapportent que l'acétyl-β-méthylcholine est hydrolysée par la cholinestérase vraie et non par la pseudo-cholinestérase. (Cette cholinestérase vraie peut être préparée exempte d'autres enzymes non spécifiques par hémolyse d'hématies lavées, adsorption sur kieselguhr et élution par soude 0,00'N : on obtient un liquide rougeâtre, d'activité 20 à 30 fois supérieure à celle des cellules initiales). La benzoylcholine au contraire n'est décomposée que par la pseudo-cholinestérase et non par la vraie cholinestérase. Utilisant cette méthode, Mundell et Rudney (1943) trouvent que le cerveau de tous les Vertébrés ne contient que de la vraie cholinestérase ; quant aux autres organes, il est impossible de porter un jugement concernant le type de cholinestérase qui s'y trouve. La vraie cholinestérase semble être localisée dans les érythrocytes de la plupart des espèces, dans quelques cas (Chat et Oiseau) dans le plasma. La pseudo-cholinestérase fait défaut dans quelques espèces (Bœuf, Mouton) et, selon Gunter (1946) (62), elle semble être absente en totalité des tissus des ruminants. Les résultats de Hawkins et Gunter (1946) (66) ont donné la preuve que la cholinestérase ne joue aucun rôle essentiel dans

l'hydrolyse de l'acétylcholine *in vivo*. A cet égard, il est intéressant de noter que Sawyer (118) a trouvé en 1945 une estérase, la « benzoylcholinestérase », dans le foie de Cobaye, ainsi que dans celui de Lapin, capable de décomposer la benzoylcholine, mais qui n'est pas active dans l'hydrolyse de l'acétylcholine.

Mendel et ses collaborateurs trouvèrent que la forme de la courbe qui représente la vitesse initiale et la concentration de substrat est changée par l'addition de KCl ou de protamine au milieu contenant la vraie cholinestérase.

Le problème de la spécificité de la cholinestérase fut aussi étudié en Suisse par Zeller et Bisseger (1943) (141) qui observèrent l'existence de deux types de cholinestérase : la cholinestérase du cerveau et des érythrocytes qui constituait le « e type », différente du « s type », ou cholinestérase du sérum sanguin. Ces deux types se distinguent par leur conduite vis-à-vis de certaines substances. Il est aussi prouvé que l'activité de la cholinestérase du cerveau est diminuée par un excès de substrat, propriété similaire à celle de la cholinestérase des érythrocytes observée par Alles et Hawes.

Langemann en 1944 (79-79*bis*) étudia les types de cholinestérase dans les différents tissus humains. Glasson et Mutrux (58), au cours d'investigations à peu près semblables, trouvent des résultats identiques quant aux cholinestérases sérique et globulaire, puis, étudiant les variations de la cholinestérase du liquide céphalo-rachidien, ils constatent, la plupart du temps, la présence d'une cholinestérase spécifique hydrolysant l'acétylcholine et dont l'activité est diminuée par l'ésérine, d'une aliestérase dont l'action sur la monobutyrine ne subit pas de modifications en présence d'ésérine et enfin dans un pourcentage assez faible de liquides céphalo-rachidiens, il existe une cholinestérase non spécifique hydrolysant l'acétylcholine et la monobutyrine, mais dont l'action est empêchée par l'ésérine, quel que soit le substrat; d'après ces auteurs, cette pseudo-cholinestérase, qui n'a d'ailleurs été mise en relation avec aucune affection particulière, pourrait résulter du passage de la cholinestérase sérique dans le liquide céphalo-rachidien.

Récemment, Augustinson (1945) (10) a étudié la cataphorèse de la cholinestérase du sérum et des érythrocytes du Cheval, et il a pu constater des différences très nettes, tandis que Nach-

mansohn et Rothenberg (106) établissaient que la phénylacétylcholine n'est hydrolysée que par la pseudo-cholinestérase, alors qu'elle ne l'est pas par la cholinestérase spécifique. Nachmansohn et Schneemann établissaient également l'effet inhibiteur de la caféine sur la cholinestérase spécifique et son absence d'action sur la pseudocholinestérase.

La plupart des auteurs constatant que l'évaluation de la cholinestérase sérique est loin de rendre les services qu'on pourrait attendre chez des individus présentant de la rigidité musculaire, l'activité cholinestérasique du sérum ne saurait servir à caractériser les troubles de la musculaire striée. Les hépatiques graves chez qui on constate d'ordinaire un abaissement massif de la cholinestérase [Vincent et Mademoiselle de Prat (137)], ne présentent généralement pas de troubles nerveux manifestes [Kaswin (76)]. On peut dire que dans leur comportement vis-à-vis des effecteurs et des divers états pathologiques, ces diastases paraissent n'avoir aucun rapport entre elles, ce qui ne veut pas dire que leur détermination soit dénuée d'intérêt; le mieux serait de compléter notre exploration chez le malade par l'évaluation de la cholinestérase nerveuse, de la cholinestérase du cerveau et de la cholinestérase musculaire, mais les difficultés inhérentes à leur prélèvement en rendent la pratique tout à fait exceptionnelle.

Ces travaux nous font donc affirmer la présence de plusieurs cholinestérases : une cholinestérase sérique non spécifique et une cholinestérase spécifique vraie (globulaire et nerveuse) qui possède une action optimum avec de faibles concentrations de substrat, en rapport avec son rôle biologique.

Tout dernièrement, des recherches que nous avons faites, concernant les variations de l'activité cholinestérasique en fonction du temps de cholinestérases provenant de sources diverses, nous ont révélé des pertes d'activité très différentes selon la source de cholinestérase; ce qui laisserait supposer, grâce à cette différence de comportement par rapport au temps, une diversité encore plus grande de ces enzymes.

Détermination de l'Action cholinestérasique. — La scission enzymatique de l'acétylcholine peut être observée et mesurée par de très nombreuses méthodes biologiques, chimiques ou biochimiques.

Méthodes biologiques. — Le principe de ces méthodes est

uniforme. Il est basé sur le dosage d'une quantité fixe d'acétylcholine avant et après l'action de tissus ou de liquides organiques. L'estimation de la quantité d'acétylcholine détruite se fait sur un réactif biologique ou par une méthode chimique.

a) *Technique générale.* — On mélange généralement à 37° une quantité déterminée d'acétylcholine à une quantité fixe de liquide organique ou de broyat de tissus. Après un temps constant, on arrête la réaction en inactivant brusquement la cholinestérase par :

— Précipitation par un acide (acide trichloracétique à 10 ou 20% — acide métaphosphorique à 5%).

Ce procédé inactive totalement la cholinestérase. Mais le dosage des extraits acides sur le réactif biologique nécessite une neutralisation stricte, ce qui est toujours délicat à obtenir. D'autre part, les acides peuvent détruire le complexe acétylcholinique et augmenter ainsi le rendement en acétylcholine des extraits.

— Précipitation par l'alcool absolu ou l'acétone.

Mais la cholinestérase n'est pas totalement inhibée par l'alcool et, après évaporation, elle peut reprendre une fraction faible de son activité première.

— Adjonction d'une forte quantité d'ésérine.

Ce procédé est de loin le plus employé ; mais l'inhibition par l'ésérine est loin d'être immédiate et complète, quelle que soit la dose d'alcaloïde employée. En effet, Easson et Stedman (1937) (41) ont montré que l'ésérine n'inhibe la cholinestérase que lentement et progressivement. Le blocage du ferment n'atteint son maximum qu'après 30 minutes de contact, et, comme l'ont remarqué Lœwi et Hellauer (1938) (85), les extraits de cerveau fortement ésérinés continuent à scinder l'acétylcholine, bien que très faiblement, car l'inhibition n'est jamais absolument totale.

— Ebullition ou immersion des mélanges dans l'air liquide ou dans l'eau bouillante.

Ce procédé donne une inhibition immédiate et il suffit de réchauffer ensuite l'extrait congelé dans du Ringer ésériné avant de pratiquer le dosage.

b) *Les réactifs biologiques.* — Ces réactifs sont des organes régis par le système cholinestérasique qui donnent, en présence d'acétylcholine à faible concentration, des réponses spécifiques,

motrices ou sécrétoires. Ce sont, d'ailleurs, les mêmes réactifs que ceux utilisés pour le dosage de l'acétylcholine. Pour ne citer que les principaux, nous signalerons le muscle dorsal antérieur éséríné de Sangsue employé depuis 1918 par Führer (52), puis par Minz (96) et par D. Vincent (132). D'après cet auteur la zone de concentration optimum pour la sensibilité du dosage s'étend presque toujours entre 1.10^{-7} et 1.10^{-8}. Selon sa technique de dosage biologique de la cholinestérase, on apprécie la dilution limite d'extrait d'organe déterminant encore après un temps de contact donné la contraction du muscle de Sangsue éséríné. Plattner et Hintner (112) déterminent le temps nécessaire à l'hydrolyse de 50% de l'acétylcholine mise à l'essai.

Chang et Gaddum (24) utilisent le muscle *rectus abdominis* de Grenouille. Halpern et Corteggiani (65) déterminent le temps nécessaire à la reprise spontanée des mouvements du cœur isolé d'Escargot arrêté par une solution d'acétylcholine. D'après Herschberg (67), si la sensibilité est variable d'un cœur à l'autre, elle est constante pour un même cœur.

Dijkstra et Noyons (1937) (39) utilisent le poumon isolé de Grenouille qui permettrait l'évaluation des quantités infimes d'acétylcholine (10^{-12} à 10^{-15}).

D'autres auteurs utilisent encore des fragments d'intestin grêle de Rat, Souris, Cobaye, Lapin, ou l'utérus de Cobaye vierge [Webster, 1935 (140)], ces organes étant innervés par le parasympathique et sensibles à l'acétylcholine. Hunt et Taveau (68) enfin dosent l'acétylcholine par la modification de la tension artérielle du Chat.

Récemment A. Denys et J. Lévy (1947) (38) ont proposé une méthode de dosage de la pseudocholinestérase sérique en présence de cholinestérase vraie spécifique, en mesurant la vitesse de décontraction du muscle rectus de Grenouille contracturé par la benzoylcholine, ester que n'hydrolyse pas la cholinestérase vraie.

Méthodes biochimiques. — Servant de transition entre les méthodes biologiques et les méthodes chimiques, Dudley (1929) (40) d'une part, Kahane et Lévy (1936) (72) d'autre part, ont mis au point un procédé consistant à doser l'acétylcholine subsistant après l'action de la cholinestérase par une méthode purement chimique. Cette méthode repose sur la possibilité

qu'offre l'acétylcholine de former des sels insolubles : perchlorates, phosphotungstates, silicotungstates, chloroaurates et surtout reineckates.

Mais l'hydrolyse spontanée et enzymatique de l'acétylcholine entraîne la scission de celle-ci en choline et acide acétique libre, et c'est précisément sur cette libération d'acide acétique que sont basées toutes les méthodes de dosage biochimique de la cholinestérase.

— L'acide acétique libéré peut être titré directement par adjonction d'un alcali que l'on verse progressivement dans le mélange où se fait la réaction, afin de maintenir pendant un temps donné (variable suivant chaque méthode) un pH arbitrairement fixé. Comme indicateur on peut se servir d'un colorant qui doit n'exercer aucun effet fonctionnel sur la cholinestérase. On peut éviter l'adjonction d'un indicateur en mesurant le pH à l'aide d'une électrode en verre. On peut déterminer le temps de passage du pH de départ à un autre pH plus acide que l'on fixe à volonté dans les limites où ce pH n'influence pas l'activité du ferment.

— L'acide acétique peut être dosé d'une manière indirecte en agissant sur un milieu bicarbonaté dont il libère quantitativement le CO_2. Le dégagement gazeux est alors mesuré. Cette technique nécessite un appareil de Warburg ou similaire.

Quoi qu'il en soit, dans tous ces dosages, on doit tenir compte de la décomposition spontanée de l'acétylcholine dans les conditions d'expérience. Il faut par conséquent instituer parallèlement au dosage une expérience à blanc où la solution de cholinestérase est remplacée par de l'eau distillée. On déduit l'hydrolyse spontanée de l'hydrolyse totale qui est fournie par le dosage, pour connaître l'action du ferment.

1° *Méthodes alcalimétriques.* — La première en date fut mise au point par Renshaw et Bacon en 1926 (114). Dans une éprouvette maintenue au thermostat à 37°, 0,5 cm^3 de sérum dilué au 1/50e dans de l'eau distillée, 5 à 7 gouttes de rouge de crésol et une quantité fixe d'acétylcholine sont mis en présence à un pH 7,8 maintenu constant pendant toute la réaction par addition dans le mélange d'un alcalin à l'aide d'une microburette. Mais ces auteurs employèrent la baryte 0,083 N, ce qui est fâcheux, car, comme l'ont montré Frommel, Herschberg et Piquet en 1944 (50), l'ion Ba^{++} est un très fort inhibi-

teur de la cholinestérase. L'adjonction de ce corps fausse donc les résultats de Renshaw et Bacon, puisque le ferment à étudier ne peut fonctionner qu'à une fraction de son rendement normal.

E. Stedman, E. Stedman et A. C. White en 1933 (123) utilisèrent la soude à 0,02 N, fixèrent le pH à 8 et la durée de l'expérience à 20 minutes.

Hall et Lucas (63) reprenant cette méthode quelques années plus tard, la perfectionnèrent, et c'est elle qui a servi de base de travail à de nombreux chercheurs. A 10 cm^3 d'eau distillée fraîchement bouillie, on ajoute une solution de bromure d'acétylcholine correspondant à 25 mgr. d'acétylcholine, 2 gouttes de solution de rouge de crésol et on ajuste à pH 8. On porte au thermostat à 37°5, on ajoute 0,5 cm^3 de sérum, on rajuste rapidement à pH 8 et on commence à partir de ce moment la titration avec de la soude 0,01 N ajoutée avec soin pour maintenir le pH à 8, en se servant d'un témoin tamponné. On fait une lecture de burette toutes les 5 minutes et la durée du dosage est de 20 minutes.

Tous ces dosages se font en titration continue à pH constant, c'est-à-dire en ajoutant la solution titrée de soude continuellement, de façon à saturer l'acide acétique formé au fur et à mesure de sa production.

Une méthode de titration discontinue, préconisée par D. Vincent, G. Segonzac et Mlle de Prat (138), consiste à n'opérer les affusions de soude que de 5 en 5 minutes. Cette méthode, que nous avons utilisée pour nos recherches et dont nous donnerons de plus amples détails dans la deuxième partie de notre travail, a le grand avantage de permettre au même opérateur d'effectuer plusieurs dosages en série. Quelques variantes de cette méthode ont été données récemment par Morand et Laborit (1947) (100), ainsi que par Paget (108) et Delhemmes (1947) (37).

Dans toutes ces méthodes, l'activité cholinestérasique est exprimée par des vitesses moyennes d'hydrolyse des esters de la choline pendant des temps arbitrairement choisis.

Tout récemment, G. Arragon et E. Sala (1948) (8) ont voulu exprimer cette activité par la vitesse initiale, c'est-à-dire par le coefficient angulaire des tangentes à l'origine des courbes d'hydrolyse et ont montré que ce facteur est indépendant de la concentration des substrats et directement proportionnel à la concentration des solutions de cholinestérase.

Dans toutes ces méthodes également, l'inconvénient des lec-

tures directes du virage de l'indicateur est l'imprécision. Valquist (1935) (125) proposa de lire ce virage au photomètre et la précision serait de 0,03 cm^3 de soude 0,1 N. Abdon et Uvnas (1937) (2), utilisant le photomètre de Pulfricht, proposent une méthode compliquée dont la précision ne dépasse pas celle de la titrimétrie.

Glick (1937) (60), voulant éviter cette imprécision dans la lecture des virages, proposa l'utilisation de la mesure électrométrique du pH à l'aide d'une électrode en verre.

2° *Méthodes manométriques.* — Cette méthode, que nous avons également utilisée au cours de nos recherches et dont nous donnerons les détails dans la deuxième partie de notre travail, fait agir l'acide acétique sur du Ringer bicarbonaté, au fur et à mesure de sa formation, libère du CO_2 titré manométriquement dans un appareil de Warburg. Cette méthode a l'avantage d'opérer à pH constant et de permettre de suivre avec plus de précision la cinétique de l'action fermentaire.

Est-il possible de donner une préférence à l'une ou l'autre de ces méthodes ? Nous ne croyons pas. Les unes et les autres présentent des avantages et des inconvénients et l'on doit adopter le procédé de choix pour chaque recherche, selon le but poursuivi.

Les méthodes biologiques s'approchent davantage des conditions physiologiques, car elles utilisent des quantités faibles de substrat et de ferment. Mais elles sont beaucoup plus difficiles à réaliser, plus longues et moins précises que les méthodes biochimiques. Elles ne peuvent que difficilement être exprimées numériquement. La rapidité et la constance des méthodes biochimiques, leur grande précision ne doivent cependant pas faire oublier que ces dosages s'éloignent des conditions physiologiques par leur durée et par l'emploi de trop fortes concentrations d'acétylcholine et de cholinestérase.

Nature chimique de la Cholinestérase. — A quoi est due cette activité et comment se manifeste-t-elle, sont autant de questions qui, petit à petit, passent du domaine de l'hypothèse dans celui de la certitude.

Ces deux questions en effet dépendent dans une certaine mesure de notre connaissance sur la nature chimique de la cholinesérase. Il est évident que cet enzyme est une

protéine. D'après Augustinsson (10), son point isoélectrique a été déterminé et fixé au pH 4,36 pour la cholinestérase sérique et au pH 4,65 pour la cholinestérase des érythrocytes (Cheval). L'enzyme qui est inactivé par dialyse peut être réactivé par addition de dialysat ou de certains cathions.

Avant lui, en 1940, Nachmansohn (104*bis*) prouva cet effet des ions bivalent et selon Massart et Dufait (91) l'ion Ca^{++} est l'activateur physiologique de la cholinestérase. Nachmansohn et Lederer ont affirmé la présence dans la molécule de cholinestérase (tissu électrique) des radicaux sulfhydryl-SH. Ils ont montré que l'enzyme est inhibé par des substances (acide maléïque, glutathion oxydé) qui sont capables de transformer les radicaux sulfhydryl-SH en radicaux disulfures-S-S- inactifs.

Mais la question s'est posée de savoir à quelle fraction protéidique du sang appartenait la cholinestérase. Les résultats ont été assez contradictoires. Stedman et Stedman (1935) (121) ont montré que l'enzyme semble lié à la fraction de protéine soluble dans $SO_4(NH_4)_2$ à 35% et précipite par ce sel à 40%, ce qui correspondrait aux euglobulines. Glick, Glaubach et Moore (1942) (60), par la méthode électro-phorétique, ont trouvé que la cholinestérase est liée aux α et β globulines. Toutefois, selon Faber (1943) (44) et Augustinsson (1944) (9), la cholinestérase est précipitée par le sulfate d'ammonium avec la fraction albumine et une relation très nette semble exister entre sérum albumine et cholinestérase. Il est à noter que Bader, Schütz et Stacey (1944-1945) (14-15) ont isolé un mucoprotéide cristallisé, à haute activité cholinestérasique, et que Barnard (18) a attribué à la cholinestérase une nature hématinique.

Ainsi donc, selon Herschberg (67), la molécule de cholinestérase pourrait s'imaginer de la manière suivante :

— La molécule de l'enzyme présenterait deux pôles d'attraction : l'un d'activité estérasique, l'autre chargé négativement, servant de fixateur du substrat.

— L'éloignement stéréochimique du radical estérifiant du groupe onium servant de fixateur, pourrait rendre la fixation sur le ferment difficile ou impossible (ex. acétylméthylcholine, acétylhomocholine).

Facteurs influençant la Cinétique de la Cholinestérase.

1° *Inhibiteurs-activateurs — cinétique de la Cholinestérase.*

Cette hypothèse de structure cholinestérasique permettrait d'expliquer dans une certaine mesure l'influence de diverses substances sur cet enzyme et serait en accord avec l'explication que les auteurs donnent de son inhibition. Ces auteurs distinguent en effet :

— La « competitive inhibition ». L'inhibiteur, possédant une structure proche de celle de la choline, peut se fixer plus ou moins rapidement sur le pôle de fixation du ferment. Il empêche ainsi l'acétylcholine de se fixer sur ce pôle, car son activité pour l'enzyme est plus grande que celle du substrat naturel. L'inhibiteur et le substrat entrent en compétition par le groupement fixateur du ferment.

— La « non compétitive inhibition » ou inhibition par immobilisation; l'inhibiteur se lie au ferment par le pôle d'activité estérasique. Le substrat naturel peut encore se lier au pôle de fixation, mais l'ester ne sera plus saponifié.

Un exemple typique de « compétitive inhibition » nous est fourni par la choline. La choline inhibe la cholinestérase, surtout en présence de faibles concentrations d'acétylcholine, alors qu'avec des fortes concentrations, l'hydrolyse se passe comme en l'absence de choline. C'est que dans la compétition pour le pôle de fixation de l'enzyme, l'acétylcholine possède une plus forte affinité que la choline. C'est la raison pour laquelle l'acétylcholine se fixe la première sur le substrat en présence de choline, d'arsénocholine ou de tétraméthylamine. L'inhibition ne se fera donc sentir qu'avec de faibles concentrations d'acétylcholine ou de fortes concentrations d'inhibiteur.

Au contraire, la compétition entre l'ésérine ou la prostigmine qui ont une affinité pour cet enzyme 30.000 et 80.000 fois supérieure à celle de l'acétylcholine se terminera invariablement par l'inhibition totale du ferment, s'il y a suffisamment de molécules d'inhibiteur pour saturer toutes les particules actives de la cholinestérase. L'inhibition ne sera que partielle si le nombre de molécules d'ésérine est insuffisant et que l'acétylcholine trouve des particules de ferment libres.

Il est aussi intéressant de citer le D. F. P. (diisopropylfluorophosphonate) qui a une telle affinité pour la cholinestérase qu'il la bloque et l'inactive irréversiblement (Mazur et Bodansky).

Nous passerons volontairement sous silence l'étude des diffé-

rents inhibiteurs et activateurs de la cholinestérase, cette étude ayant déjà fait l'objet de nombreuses publications. Seul le principe a paru devoir retenir notre intérêt, car il contribue à expliquer la cinétique de cet enzyme.

En effet, au fur et à mesure de la destruction enzymatique du substrat, la fonction de la cholinestérase se ralentit de sorte que, comme l'ont montré Clark et Raventos, le temps d'hydrolyse double si l'on passe d'une solution d'acétylcholine de 10^{-6} à 10^{-9}.

Des quantités décroissantes d'acétylcholine peuvent rester plusieurs secondes avec l'enzyme sans être détruites complètement. Par exemple, un sérum agissant sur l'acétylcholine en hydrolyse rapidement 80%, mais les 20 derniers % subissent une scission enzymatique beaucoup plus lente, la courbe d'hydrolyse s'inclinant vers l'horizontale. Ainsi, d'après Bender, des quantités infinitésimales d'acétylcholine peuvent rester non hydrolysées et circuler dans le sang sans être détruites.

Les causes de cette modification de l'hydrolyse avec de faibles concentrations de substrat résident dans le fait que les produits de scission, en particulier la choline, exercent une « competitive inhibition » sur la cholinestérase. Roepke (1937) (116) a montré que l'affinité de la choline pour la cholinestérase est de 75, si celle de l'acétylcholine est de 100. Tant que l'acétylcholine est en quantité abondante, elle se fixe de préférence à la choline, sur les parties réceptrices du ferment; mais dès que de faibles concentrations d'acétylcholine et des concentrations croissantes de choline se rencontrent sur les récepteurs du ferment, la compétition s'établit, le ferment est partiellement inhibé, et cela d'autant plus que la choline continue à s'accumuler par la scission de plus en plus ralentie de l'acétylcholine.

Les résultats que nous avons obtenus avec différents esters choliniques (deuxième partie) transcrivent d'une manière objective les faits que nous venons d'expliquer ci-dessus.

2° *Effet de la concentration en enzyme.*

A côté des inhibiteurs et activateurs de la cholinestérase, il existe d'autres facteurs dont l'action modifie sensiblement la cinétique de cet enzyme. C'est ainsi que la vitesse de réaction est directement proportionnelle à la concentration de l'enzyme. Il est bien évident que cette proportionnalité varie avec le temps de la réaction. Les solutions contenant de fortes con-

centrations de l'enzyme hydrolysant plus rapidement que les autres l'acétylcholine, les vitesses de réaction des premières vont diminuer plus rapidement par suite de la disparition du corps à transformer (loi d'action de masse). Mais dans l'intervalle de 0 à 20 minutes où toutes les réactions présentent leur maximum de vitesse, nous pouvons admettre que des doses doubles de sérum multiplient par deux la vitesse d'hydrolyse d'une même quantité d'acétylcholine.

3° *Effet de la concentration du substrat.*

L'étude des relations entre l'activité cholinestérasique et la concentration du substrat a été d'un grand intérêt dans le développement de notre connaissance du facteur qui hydrolyse l'acétylcholine. Cette relation est un des premiers jalons dans la différenciation des deux cholinestérases. Ainsi la cholinestérase spécifique est dite inhibée par un excès de substrat, tandis que la cholinestérase non spécifique ne l'est pas.

4° *Effet de la température.*

Le froid paralyse l'activité de la cholinestérase et permet de conserver des extraits acétylcholiniques à la glacière, alors qu'à la température ordinaire ils deviennent inactifs en peu de jours.

A 56°, l'enzyme commence à être détruit et à 70° l'activité a presque entièrement disparu. Entre 37° et 40° au contraire, l'activité atteint son maximum.

5° *Effet du temps.*

On constate une baisse lente et progressive de cette activité en fonction du temps. Toutefois, même sur les sérums les plus anciens, tels des sérums thérapeutiques périmés depuis longtemps, il persiste une activité cholinestérasique encore considérable bien que fortement diminuée. La chute cholinestérasique est d'abord relativement rapide au cours de la première année de conservation où elle peut atteindre 30% ou même davantage, puis tout en continuant à baisser lentement, elle tend à une stabilisation relative [Broca (22)]. La perte d'activité est moins rapide si le sérum est conservé à la glacière au lieu d'être gardé à la température ordinaire. Le sérum desséché sous vide à basse température garde une forte activité cholinestérasique qui fait présumer que le sérum desséché représente

la forme la meilleure pour la conservation de ses propriétés fermentaires [D. Vincent et J. Broca (134)].

6° *Effet de la concentration des ions H^+.*

D'après Plattner et Galèhr (111), la concentration des ions H^+ joue, elle aussi, un rôle de premier plan. A pH 2 la cholinestérase non spécifique du sérum de Cheval est complètement détruite.

En milieu alcalin, l'activité diminue à partir de pH 11, mais à un tel pH l'hydrolyse spontanée est très rapide.

Avec la cholinestérase spécifique des érythrocytes, à pH 4,5, l'enzyme est totalement détruit. La stabilité vis-à-vis des alcalins semble être moindre que pour la cholinestérase du sérum.

Le pH optimum de la cholinestérase non spécifique a été établi par Easson et Stedman (41) entre 8 et 8,5, celui de la cholinestérase spécifique entre 7,5 et 8. [Alles et Hawes (4)].

Le pH isoélectrique déterminé par électrophorèse a donné à Augustinsson (1944) les résultats suivants : 4,36 pour la cholinestérase du sérum et 4,65-4,70 pour celle des hématies de Cheval. La différence observée est un argument de plus pour montrer qu'il s'agit de deux enzymes différents.

Deuxième Partie

Recherches personnelles

CHAPITRE PREMIER

Exposé des Techniques utilisées pour le Dosage des Cholinestérases

I) MÉTHODE ALCALIMÉTRIQUE.

La première méthode de titration que nous avons utilisée pour nos recherches est la technique alcalimétrique courante de dosage de la cholinestérase sérique, inspirée d'après E. Stedman, E. Stedman et A.-C. White (121), adaptée par D. Vincent, G. Segonzac et De Prat (136).

Principe :

Ce dosage consiste à titrer alcalimétriquement l'acide acétique libéré par l'hydrolyse d'une solution d'acétylcholine en présence de cholinestérase sérique (Homme, Cheval), en laissant la réaction enzymatique s'opérer à température constante dans un thermostat à 38°. Le pH du milieu est contrôlé par la présence d'un indicateur coloré, le rouge de crésol, qui vire au rose pâle à pH 8 et reste jaune au-dessous. Une alcalinité trop forte pourrait en effet provoquer une hydrolyse spontanée de l'acétylcholine.

La titration se fait par addition de soude 0,01 M de 5 en 5 minutes, de façon à ramener chaque fois le pH à son point de départ, c'est-à-dire qu'on atteint le virage de l'indicateur au rose pâle. On continue le dosage pendant 20 minutes et le volume de la solution sodique employé rend compte de l'activité

cholinestérasique du sérum étudié, pour une concentration en ester cholinique déterminée, compte tenu cependant du volume de soude nécessaire à compenser la légère hydrolyse spontanée de cette solution.

Naturellement, une diminution ou une augmentation de la concentration en ester cholinique se traduira par une augmentation ou une diminution du volume de solution sodique. De plus, cette méthode nous permet de faire plusieurs dosages simultanément, ce qui est un avantage considérable sur la méthode originelle.

Technique :

Appareils et réactifs nécessaires :

— Un thermostat (électrique ou au gaz) réglable à 38°, pourvu d'un dispositif permettant le maintien dans l'eau des ballons qui doivent baigner jusqu'au col et pouvoir être retirés rapidement et facilement pour les affusions de soude à effectuer.

— Une série de burettes graduées au 1/20e de cm3.

— Une série d'éprouvettes graduées de 50 cm³.

— Une série de ballons d'une contenance de 100 cm³.

— Plusieurs pipettes de 1, 2, 5, 10 et 20 cm³.

— De l'eau distillée bouillie conservée en flacons soigneusement bouchés.

— Une solution de chlorure d'acétylcholine à 2 p. 1000.

— Une solution titrée de soude 0,01 M non carbonatée.

— Une solution de rouge de crésol à 0,02 p. 100.

— Du sérum (Homme ou Cheval) non hémolysé, mais normalement exsudé.

2° *Mode opératoire :*

Le protocole des opérations s'établit comme suit :

Dans une éprouvette graduée de 50 cm³ on introduit successivement :

10 cm³ de solution d'acétylcholine à 2 p. 1000.

10 gouttes de la solution de rouge de crésol.

On ajoute 20 cm³ environ d'eau distillée bouillie. On amène, par addition de soude 0,01 M, le mélange au pH 8 (coloration rose pâle) et on complète à 49 cm³ avec de l'eau distillée bouillie.

On transvase le contenu de l'éprouvette dans le ballon qu'on porte au bain-marie à 38°. On l'y abandonne 10 minutes afin que se réalise l'équilibre de température. On ajoute ensuite

1 cm³ de sérum, on rajuste rapidement à pH 8, on replace le ballon dans le thermostat et on note le temps qui marque le début du dosage proprement dit.

Ces opérations préliminaires achevées, on met la burette à 0, on attend 5 minutes exactement à partir de l'addition du sérum et on exécute la première affusion de soude. On fait ainsi 4 séries d'affusions successives, mais sans ramener au 0 et en notant le volume total de soude 0,01 M utilisé pour ramener au pH voulu.

L'activité cholinestérasique du sérum étudié est donnée par simple lecture sur la burette du volume de solution sodique 0,01 M utilisée (N cm³), en ayant soin toutefois de retrancher le volume de soude nécessaire pour le témoin contenant l'ester cholinique seul dans les mêmes conditions (n cm³).

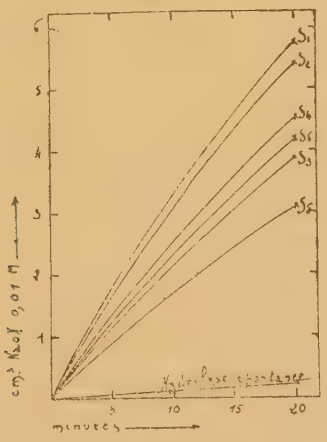
(N-n) cm³ soude 0,01 M = activité cholinestérasique du sérum.

En pratique, on peut faire 6 à 7 dosages à la fois, ce qui, avec la solution témoin, nécessite un jeu de 7 à 8 burettes correspondant chacune à un ballon déterminé.

Voici du reste à titre d'exemple les différentes courbes représentant l'activité cholinestérasique de six sérums de Cheval.

La figure I montre clairement que le sérum S1 est celui qui a la plus forte activité cholinestérasique, alors que le Sérum S5 au contraire est celui qui a la plus faible.

Fig. 1



Activité cholinestérasique de six sérums de Cheval

Il est nécessaire pour effectuer ce dosage d'opérer au thermostat à une température rigoureusement identique et constante, et surtout d'observer un même intervalle de temps entre les 4 séries d'affusions d'un dosage, d'utiliser des réactifs absolument identiques.

— Eau distillée privée de CO_2.
— Solution de soude préparée avec l'eau distillée bouillie.
— Sérum de Cheval homogène et non hémolysé.

II) Méthode manométrique.

La méthode manométrique de Warburg permet de mesurer la vitesse des réactions chimiques à laquelle des gaz prennent part ou qui sont liées à des modifications gazeuses. Cette méthode est très utilisée en biochimie animale grâce aux avantages qu'elle présente par rapport aux autres méthodes : grande simplicité, faible quantité de matières nécessaire (quelques mgr. de tissus) et enfin possibilité de suivre la réaction tout au cours de son développement.

C'est Ammon (5) qui, en 1933, proposa de doser l'activité de la cholinestérase en utilisant cette méthode.

Principe. — L'action de la cholinestérase sur l'acétylcholine en milieu bicarbonaté libère de l'acide acétique qui déplace l'anhydride carbonique du bicarbonate de soude et donne un dégagement gazeux que l'on peut suivre grâce à des lectures manométriques.

Technique : 1° Appareillage et réactifs nécessaires.

A) Un Appareil de Warburg

Les divers éléments qui composent cet appareil et que nous examinerons tour à tour sont les suivants :

— **Un bac thermostatique** d'une capacité de 100 litres environ dans lequel plongent les cuves. Ce bac, plein d'eau, porté à la température désirée, doit éviter le plus possible les pertes de chaleur, afin de prévoir toutes variations trop rapides de la température. Sa paroi inférieure repose sur un support, sa partie supérieure est ouverte pour permettre le passage et l'agitation des cuves. Les parois du bac thermostatique sont en métal poli, ce qui permet une réflection maximum de la

chaleur et une absorption minimum de cette dernière par la face interne.

— **Le système thermostatique.** — L'eau du bac doit être à une parfaite égalité thermique pendant toute l'expérience afin que le contenu des cuves présente la même régularité thermique. Le thermostat placé sur notre appareil n'est autre qu'un régulateur électro-magnétique permettant de maintenir aux environs de 38° une température constante à 1/20e de degré près. L'égalité thermique est d'ailleurs constamment vérifiée par un thermomètre gradué en 1/20e de degré et par une cuve manométrique utilisée comme thermo-baromètre.

— **L'appareil d'agitation** qui répond à un double but :

1° Agiter l'eau pour l'homogénéiser thermiquement : cette agitation est obtenue par des palettes à axe vertical mues par un moteur par l'intermédiaire de poulies.

2° Agiter les cuves de façon à ce que leur contenu soit thermiquement homogène. Ces cuves portées par des supports en bois, viennent s'enfiler sur des tenons métalliques. Ceux-ci sont fixés par l'intermédiaire d'axes à frottement doux sur deux pièces métalliques, l'une fixe, l'autre servant de biel'e. Cette dernière a son bout fixé sur une roue, à une certaine distance réglable du centre, par l'intermédiaire d'un axe à frottement doux. Le tout est entraîné par un système de poulies reliées au moteur général. Le mouvement de la bielle se transmet aux cuves avec une plus ou moins grande amplitude, suivant la position de l'excentrique sur sa poulie.

— **Les manomètres** que nous avons utilisés sont les manomètres simples du type employé par Warburg. Ils se composent d'un tube en U qui communique à sa base avec un tube fermé en caoutchouc. On peut déplacer la solution manométrique, grâce à une vis, et maintenir ainsi constant le volume de la chambre d'essai. La graduation du manomètre est réalisée en millimètres et s'étale sur 300 mm. Le diamètre intérieur du tube manométrique doit être de 0,8 à 1,2 mm.

Les tubes manométriques sont fixés sur des supports qui soutiennent aussi les vis de pression et une plaque en métal permettant de les poser sur les agitateurs.

Le liquide utilisé dans les manomètres est le liquide de Bro-

die qui, tout en mouillant bien le verre, a l'avantage suivant : la pression normale exprimée en hauteur de la solution de Brodie est très voisine, à la température ordinaire de 10.000 mm. La solution de Brodie est constituée de la façon suivante :

Taurocholate de Na Merck. 5 gr. dans 500 cm³ d'eau.
ou gallate de sodium ..... 5 gr.
ou cholalate de sodium .... 5 gr.
ClNa ..... 23 gr.

— **Les cuves,** en forme conique, se terminent à la partie supérieure par un orifice rodé permettant de les fixer à un manomètre. Ces cuves comportent deux cupules, l'une centrale, destinée à recevoir une solution basique de soude ou de potasse, servant à fixer l'anhydride carbonique, et qui n'est d'aucune utilité pour les déterminations qui nous intéressent ici ; l'autre latérale, destinée à recevoir les solutions de réactifs divers qui seront versés au moment voulu dans la solution centrale.

Le graissage des cuves pose un problème difficile : le parfait isolement des cuves, pour que l'eau du bac ne suinte pas à l'intérieur. Le produit de graissage doit donc avoir un point de fusion nettement supérieur à la température de 38° qui est celle de l'eau dans laquelle sont plongées les cuves et être assez mou à la température ordinaire pour permettre l'enduit facile de ces dernières.

Aucun des lubréfiants ou mélange de lubréfiants utilisés ne nous a donné entière satisfaction : ou ils sont trop mous à 38° et le bouchon de la cuve latérale se soulève sous l'effet de la pression exercée par l'anhydride carbonique, ou leur consistance est trop forte à la température ordinaire et ne permet pas une étanchéité suffisante des cuves.

Enselme emploie de la paraffine solide qu'il coule dans la jointure des cuves et ne plonge celles-ci dans le bac thermostatique qu'après la solidification complète de la paraffine. Or la paraffine à 38° se ramollit beaucoup trop et nous avons encore constaté avec ce procédé un soulèvement du bouchon de la cupule latérale sous l'effet de la pression gazeuse.

Nous avons résolu ce problème délicat en fixant les bouchons des cupules latérales au moyen d'un petit ressort en spirale fixé de part et d'autre de ce bouchon et passant sous la cupule. De cette façon les soulèvements ne sont plus à craindre et le graissage des cuves peut s'effectuer avec n'importe quel lubréfiant de laboratoire.

Le volume des cuves a été déterminé par une pesée au moyen de mercure. La cuve remplie de mercure est fixée au manomètre; par là le tube capillaire se remplit en partie de mercure. Le reste du tube capillaire est rempli de mercure depuis le dehors. L'ouverture supérieure de la branche gauche étant fermée, on applique brusquement un tube de caoutchouc rempli de mercure. Par le robinet supérieur ouvert, on laisse couler le mercure jusqu'à la graduation désirée. Le poids du mercure ne doit pas différer de 0,1 pour deux mesures du même récipient.

Dans la pratique, lorsque nous sommes obligés d'intervertir cuves et manomètres pour une raison quelconque, nous corrigeons les résultats obtenus en les multipliant par un coefficient manométrique dont nous donnerons les détails de l'obtention au chapitre suivant (p. 67).

Mélange gazeux. — Dans les cuves, les liquides en réaction sont au contact de l'atmosphère gazeuse qui pour nos expériences n'est autre que l'azote carbonique à 5%.

Le mélange gazeux livré sous pression dans les cylindres habituels du commerce, est passé tout d'abord à travers un tube vertical immergé dans l'eau : il contrôle le maximum de pression de gaz possible dans les manomètres. Le mélange gazeux, ainsi humidifié, est distribué au moyen d'un tube à six voies dans les différents manomètres.

D'après Krebs, la durée du barbotage dans les cuves doit être en général de 12 à 15 minutes. Pratiquement, n'ayant pas observé de variations dans nos résultats avec un barbotage de 3 à 5 minutes, c'est ce laps de temps que nous observerons au cours de toutes nos expériences.

B) Le milieu de réaction

A l'intérieur des cuves, les différents éléments à étudier baignent dans un milieu de réaction isotonique au sérum, la solution de Ringer bicarbonatée, qui a la composition suivante :

ClNa à 0,9%	100 cm³
CO_3HNa à 1,26%	20 cm³
$CaCl_2$ à 1,76%	2 cm³
KCl à 1,2%	2 cm³

C) Obtention de différentes sources de cholinestérase

1° **Le sérum** (de Cheval ou humain) doit être normalement exsudé et non hémolysé. Après son prélèvement, il est abandonné pendant une nuit à la glacière et centrifugé le lendemain matin, jusqu'à obtention d'un liquide clair.

Pour nos expériences, nous utilisons une solution de sérum dilué à 1,25% dans du Ringer bicarbonaté. Mais, si l'activité cholinestérasique de cette solution n'est pas suffisante. on peut, pour l'essai qui nous intéresse, doubler, tripler... la concentration de la solution sérique, et la vitesse d'hydrolyse étant proportionnelle à la concentration de l'enzyme (Matthes-Malbec) nous obtiendrons au bout de 30 minutes que dure un dosage, un dégagement 2 fois, 3 fois... plus grand de CO_2 dû à une libération 2 fois, 3 fois... plus grande d'acide acétique.

2° **Les hématies** proviennent de sang de Cheval ou d'Homme, recueilli sur 1/10^e de solution de citrate de soude à 4% pour empêcher sa coagulation.

Le sérum qui surnage est séparé par décantation, centrifugé et peut être utilisé pour notre méthode, malgré la légère inhibition que provoque la citrate de soude sur la cholinestérase sérique.

Les hématies sont centrifugées et lavées à plusieurs reprises dans du sérum physiologique, jusqu'à ce que le liquide surnageant soit parfaitement limpide. On prépare alors un hémolysat d'hématies au 1/10^e dans de l'eau distillée. On termine par l'addition des différents sels nécessaires pour atteindre leur concentration dans le Ringer bicarbonaté.

Rien ne s'oppose comme pour le sérum à augmenter la concentration globulaire, si l'activité cholinestérasique se révèle insuffisante.

3° **Les cerveaux** utilisés au cours de nos recherches ont été des cerveaux frais de mouton. Nous prélevons 2 gr. de substance grise, partie cervicale riche en cholinestérase. Après les avoir finement broyés dans un mortier, nous les mettons en suspension dans 40 cm^3 d'une solution de Ringer bicarbonaté que nous abandonnons au repos de la glacière. Au moment de l'emploi, il faudra agiter fortement le récipient contenant la suspention afin de l'homogénéiser.

Il sera possible comme pour le sérum et les globules d'augmenter la concentration en substance grise si l'activité cholinestérasique se révèle trop faible.

2° *Mode opératoire.* — Six cuves du modèle décrit précédemment sont numérotées de 1 à 6 et alignées côte à côte sur une table de laboratoire.

Dans les 4 premières qui serviront à suivre la réaction, on ajoute tour à tour :

— dans les cuves centrales 2 cm³ de la solution sérique à 1,25% dans du Ringer bicarbonaté;

— dans chacune des cupules latérales : 0,5 cm³ de solution acétylcholinique à 4%.

La cuve 5, réservée à l'hydrolyse spontanée recevra 0,5 cm³ de solution acétylcholinique à 4% et 2 cm³ de Ringer bicarbonaté.

La cuve 6 qui servira de thermobaromètre ne recevra que 2,5 cm³ de solution de Ringer bicarbonaté.

On graisse convenablement les extrémités rodées des manomètres placés préalablement sur un support commun et on adjoint à chacun d'eux la cuve correspondante en ayant soin de lui imprimer un mouvement tournant de façon à répartir le lubréfiant aussi uniformément que possible et à assurer une étanchéité parfaite. On fixe définitivement chaque cuve à son manomètre par l'intermédiaire de deux petits ressorts spiralés accrochés à des ergots latéraux.

On place le tube à six voies qui sera chargé de distribuer le mélange gazeux dans les cuves, sur les branches des manomètres où se trouve le robinet d'introduction du gaz. On ouvre légèrement le robinet du cylindre où se trouve l'azote carbonique sous pression, et on laisse le barbotage s'effectuer durant 3 à 5 minutes, temps pendant lequel on graisse les bouchons des cupules latérales et on les place imparfaitement sur ces dernières de façon à laisser passer le courant gazeux.

Lorsque cette opération est terminée, on ferme tour à tour le robinet du cylindre, puis ceux des manomètres. On obture les cupules latérales à l'aide des différents bouchons en leur imprimant un mouvement de rotation. Ces derniers sont définitivement fixés aux cupules latérales grâce à un ressort spiralé passant sous ces cupules et accroché à deux ergots placés latéralement sur chaque bouchon.

L'étanchéité du système sera ainsi parfaitement réalisée et on

n'aura pas à craindre un soulèvement des bouchons, sous l'influence de la pression gazeuse dégagée au cours de la réaction.

Les robinets d'introduction de gaz sont alors ouverts, car l'augmentation de température, produite par l'eau du bain, provoque une augmentation de pression à l'intérieur des cuves, capable de faire déborder le liquide de Brodie par la branche ouverte des manomètres.

L'égalité de température est pratiquement réalisée au bout de 5 minutes.

On mélange alors la solution cholinestérasique avec le substrat par inclinaison rapide du manomètre, de façon à ce que la solution de sérum vienne en contact avec la solution acétylcholinique. On incline le manomètre dans le sens opposé : le mélange des liquides qui se trouve dans la cupule latérale passe dans la cupule centrale et on recommence cette opération deux fois pour que tout le substrat vienne bien au contact de la solution sérique.

On met en marche l'appareil d'agitation des cuves; on laisse la réaction s'amorcer pendant 5 minutes que l'on occupe à mouiller les manomètres par le liquide de Brodie et on ramène le niveau de ce dernier à la graduation 15 choisie arbitrairement pour tous les manomètres, comme point de départ de la réaction.

Ce laps de temps écoulé, on ferme tous les robinets d'introduction de gaz et on laisse la réaction fermentaire évoluer pendant 30 minutes en faisant des lectures toutes les 10 minutes. Pour cela on diminue l'agitation des cuves, on repousse la solution de Brodie de quelques millimètres plus haut que la graduation 15°, afin que les tubes manométriques soient humectés; on place le ménisque de la branche du manomètre qui porte la cuve, sur le niveau de la graduation 15 choisie comme 0 et on lit la pression exercée par le gaz sur la branche du manomètre communiquant avec l'atmosphère.

Les lectures doivent être faites aussi vite que possible et la pression exercée par le gaz au sein du système est donnée par la différence entre le chiffre lu sur le manomètre d'une cuve à réaction et celui donné par le thermobaromètre.

A la fin de chaque dosage, les cuves sont soigneusement lavées à l'eau distillée et séchées.

3° *Calcul de la quantité totale du gaz produit à l'intérieur de chaque cuve.* — Le problème consiste à calculer la quantité

de gaz qui apparaît en fonction de l'augmentation de pression à volume constant.

Au moment où le gaz commence à se former, règne dans le récipient une pression P que nous nommerons « pression initiale » et qui sera égale à la pression atmosphérique. A la fin des dégagements gazeux, il règne dans le récipient une pression plus élevée ; si nous désignons par h la différence de pression lue sur le manomètre, la pression finale est P+h, P et h étant exprimé en mm³. du liquide Brodie. Posons :

V_G : le vol. de gaz en mm³.

V_F : le vol. du liquide introduit en mm³. (2500).

T : la température absolue au moment de l'expérience (311).

α : le coefficient d'absorption de Bunsen des gaz formés (0,56 pour CO_2 à 37,5°).

Po : la pression normale en mm³. de liquide de Broglie (10.000).

L'augmentation du gaz dans l'atmosphère du récipient est en mm³.

$$\frac{P + h}{Po} \frac{273}{T} V_G - \frac{P}{Po} \frac{273}{T} V_G = \frac{h}{Po} \frac{273}{T} V_G \qquad (1)$$

La quantité de gaz apparue dans la solution est en mm³.

$$\frac{h}{Po} V_F \alpha \qquad (2)$$

La somme de ces deux termes représente la quantité totale de gax produite : x.

$$x = h \left(\frac{V_G \frac{273}{T} + V_F \alpha}{Po} \right) \qquad (3)$$

x est ainsi proportionnel à h et indépendant de la pression initiale P.

L'expression entre parenthèses de l'équation (3) est la « constante du récipient ».

La méthode est d'autant plus sensible que cette constante (k) est plus petite.

CHAPITRE II

Résultats concernant l'hydrolyse de divers esters de la choline en présence de différentes cholinestérases

A. — Résultats obtenus par la Méthode alcalimétrique.

La première méthode utilisée pour nos recherches a été la méthode alcalimétrique décrite précédemment.

Nous avons utilisé pour tous nos essais des solutions salines d'ester cholinique à 2 p. 1000 dans de l'eau distillée privée de CO_2, nous permettant de faire varier la quantité de substrat de 5 à 40 mgr.

La quantité de cholinestérase a toujours été constante et égale à 1 cm^3 de sérum de Cheval.

Les courbes d'hydrolyse des esters choliniques en fonction du temps ont été construites d'après les résultats de nos expériences en portant aux abcisses les temps et aux ordonnées les volumes de soude consommés.

Les concentrations en substrat utilisées pour la méthode alcalimétrique sont données par le tableau de la page 60.

1) *Hydrolyse d'une même quantité de divers esters choliniques par la cholinestérase du sérum de Cheval.*

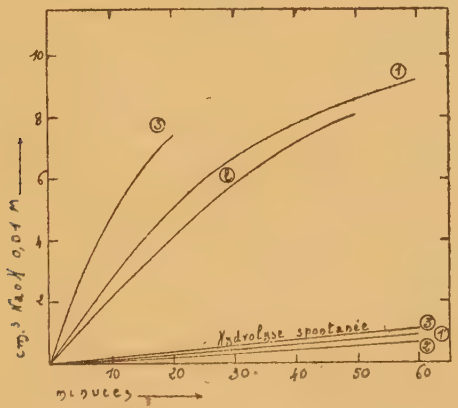
Au cours de nos recherches nous avons étudié l'hydrolyse de 20 mgr. de chlorures d'acétylcholine, d'acétyl-ß-méthylcholine, de carbaminoylcholine, 20 mgr. de perchlorates de benzoylcholine et de propionylcholine, ainsi que l'hydrolyse spontanée de chacun de ces esters.

Nous adressons nos bien sincères remerciements à M. le Professeur Mendel de Toronto qui a eu l'extrême obligeance de nous faire parvenir quelques échantillons d'esters choliniques

Nous remercions également M. le Directeur des Laboratoires Lematte et Boinot pour le stock d'acétylcholine qu'il a bien voulu mettre à notre disposition.

Les résultats représentés par la figure 2 révèlent une activité cholinestérasique du sérum de Cheval plus ou moins grande

Fig. 2



Courbes d'hydrolyse enzymatique d'une même quantité (20 mgr.) de chlorure d'ACh (I), de perchlorates de BzCh (II) et de PrCh (III) par la ChE du sérum de Cheval (l'action sur l'AMeCh et la CbCh est nul et la courbe se confond avec l'axe des abcisses)

suivant qu'il s'agit d'acétylcholine ou de propionylcholine et une absence totale d'activité vis-à-vis de l'acétyl-δ-méthylcholine et de la carbaminoylcholine.

Les calculs montrent que 20 mgr. de chlorure d'acétylcholine libèrent sous l'influence de la cholinestérase la même quantité de choline que 33,8 mgr. de perchlorate de benzoylcholine ou que 28,5 mgr. de perchlorate de propionylcholine.

Or l'expérience prouve que l'activité de la cholinestérase, au bout de 20 minutes, vis-à-vis

de l'acétylcholine est de 5,4,
de la benzoylcholine : 4,
de la propionylcholine : 9,

alors que les temps d'hydrolyse totale sont respectivement de :

115 minutes pour l'acétylcholine,
75 minutes pour la benzoylcholine,
35 minutes pour la propionylcholine.

Ceci montre que, si l'activité de la cholinestérase pour l'acétylcholine est de 100, cette activité s'abaisse à 80 vis-à-vis de la benzoylcholine, alors qu'elle s'élève à 180 vis-à-vis de la propionylcholine.

Tableau des concentrations en substrat (chlorures) utilisées pour la méthode alcalimétrique

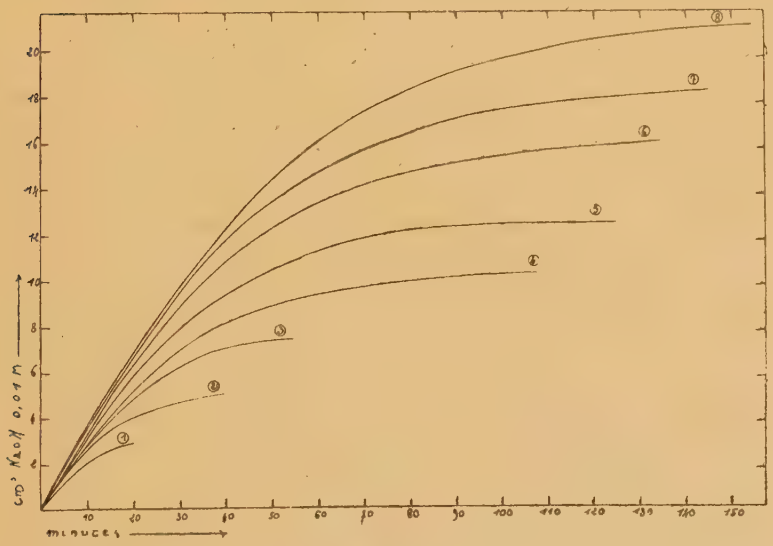
N° des courbes	Substrat en mgr. de chlorure dans vol. de 50 cm3	Acétylcholine ACh	Benzoylcholine BzCh	Propionycholine PrCh	Acétyl-ξ-métyl-choline AMeCh	Carbaminoyl-choline CbCh
1	5 . ..	$5{,}51 \times 10^{-4}$M ..	$4{,}10 \times 10^{-4}$M ..	$5{,}11 \times 10^{-4}$M ..		
2	10	$1{,}10 \times 10^{-3}$M ..	$8{,}21 \times 10^{-4}$M ..	$1{,}02 \times 10^{-3}$M ..		
3	15	$1{,}65 \times 10^{-3}$M ..	$1{,}23 \times 10^{-3}$M ..	$1{,}53 \times 10^{-3}$M ..		
4	20	$2{,}20 \times 10^{-3}$M ..	$1{,}64 \times 10^{-3}$M ..	$2{,}04 \times 10^{-3}$M ..	$2{,}04 \times 10^{-3}$M ..	$2{,}18 \times 10^{-3}$M ..
5	25	$2{,}75 \times 10^{-3}$M ..	$2{,}05 \times 10^{-3}$M ..	$2{,}55 \times 10^{-3}$M ..		
6	30	$3{,}30 \times 10^{-3}$M ..	$2{,}46 \times 10^{-3}$M ..	$3{,}06 \times 10^{-3}$M ..		
7	35	$3{,}85 \times 10^{-3}$M ..	$2{,}87 \times 10^{-3}$M ..	$3{,}57 \times 10^{-3}$M ..		
8	40	$4{,}40 \times 10^{-3}$M ..	$3{,}28 \times 10^{-3}$M ..	$4{,}09 \times 10^{-3}$M ..		

Quant au temps d'hydrolyse totale, il révèle une activité anticholinestérasique de la choline, très faible lorsqu'il s'agit de la propionylcholine, plus importante vis-à-vis de la benzoylcholine et considérable en présence d'acétylcholine. Ceci montre que si l'affinité pour la cholinestérase de la propionylcholine est de 100, elle n'est plus que de 65 pour la benzoylcholine et de 34 pour l'acétylcholine, l'influence des anions, chlorure ou perchlorate étant négligeable [Kahane, E., et Kahane, M. (70)].

2° *Hydrolyse de quantités croissantes d'acétylcholine par la cholinestérase sérique.*

Les courbes d'hydrolyse transcrites sur la figure 3 nous mon-

Fig. 3



Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure d'ACh par la ChE du sérum de Cheval en fonction du temps
I. — 5 mgr; II. — 10 mgr; III. — 15 mgr; IV. — 20 mgr;
V. — 25 mgr; VI. — 30 mgr; VII. — 35 mgr; VIII. — 40 mgr.

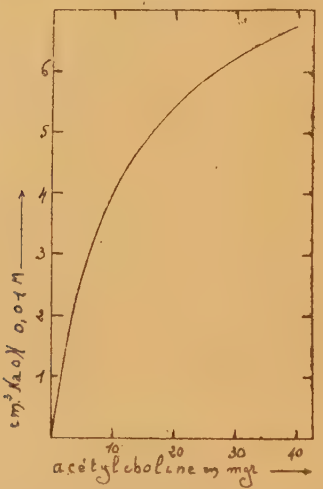
trent une activité croissante de la cholinestérase du sérum de Cheval en présence de quantités toujours plus élevées d'acétylcholine.

Pendant la première moitié de la réaction, c'est-à-dire au cours de la demi-hydrolyse, les courbes d'hydrolyse sont représentées par des droites, mais rapidement ces courbes s'incli-

nent vers l'horizontale et la vitesse d'hydrolyse diminuant considérablement, la fin de la réaction n'est atteinte qu'au bout d'un temps environ trois fois plus long que celui de la demi-hydrolyse ; ceci dénote une nette action anticholinestérasique exercée par la choline libérée dans le milieu.

Si, au temps 20 minutes, nous coupons toutes ces courbes d'hydrolyse par une parallèle aux ordonnées et que nous construisions la courbe d'hydrolyse de l'acétylcholine non plus en fonction du temps, mais en fonction de la concentration en substrat (figure 4), nous constatons à partir de 30 mgr., que

Fig. 4



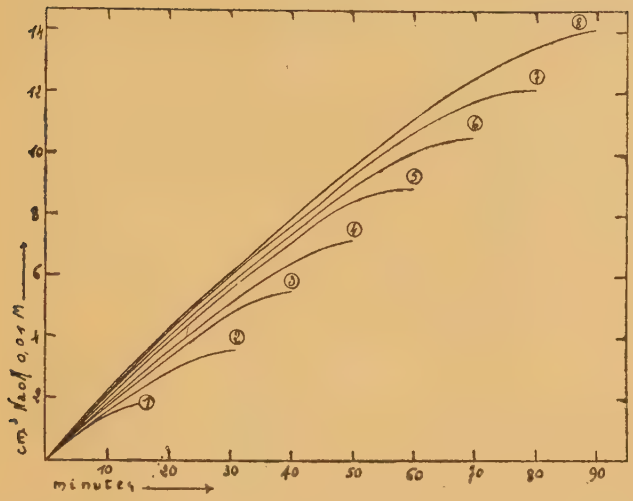
Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure d'ACh par la ChE du sérum de Cheval en fonction de la concentration en substrat indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

l'activité cholinestérasique du sérum de Cheval ne progresse plus autant, la courbe ayant légèrement tendance à se rapprocher de l'horizontale.

3° *Hydrolyse de quantités croissantes de benzoylcholine par la cholinestérase du sérum de Cheval.*

L'expérience montre en ce qui concerne la benzoylcholine (figure 5) que pendant les trois-quarts de la réaction, la vitesse d'hydrolyse est représentée par une droite : les courbes d'hydrolyse ne se rapprochent de l'horizontale que vers la fin de la réaction, ce qui prouve que l'accumulation de choline dans le

Fig. 5

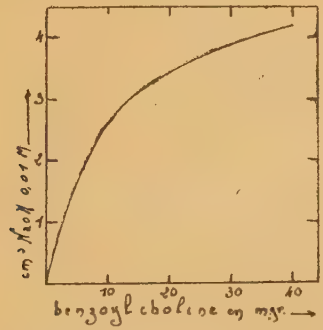


Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure de BzCh par la ChE du sérum de Cheval en fonction du temps
I. — 5 mgr; II. — 10 mgr; III. — 15 mgr; IV. — 20 mgr;
V. — 25 mgr; VI. — 30 mgr; VII. — 35 mgr; VIII. — 40 mgr.

milieu n'influence que fort peu l'action enzymatique de la cholinestérase sur la benzoylcholine. L'affinité de l'enzyme pour cet ester cholinique est donc plus grande que son affinité pour l'acétylcholine.

La courbe d'hydrolyse en fonction de la concentration en

Fig. 6



Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure de BzCh par la ChE du sérum de Cheval en fonction de la concentration en substrat, indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

celle de l'acétylcholine : elle a tendance à se rapprocher de l'horizontale avec la concentration en substrat.

4° *Hydrolyse de quantités croissantes de propionylcholine par la cholinestérase du sérum de Cheval.*

Avec la propionylcholine la cholinestérase manifeste toujours une activité croissante en présence de quantités croissantes de substrat (figure 7). Pendant les trois-quarts de la réaction, les

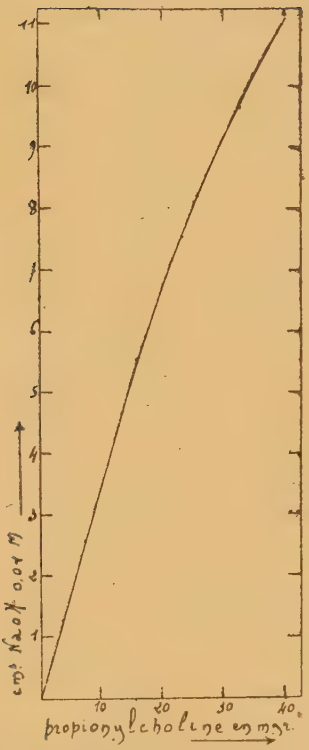
Fig. 7

Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure de PrCh par la ChE du sérum de Cheval en fonction du temps
I. — 5 mgr; II. — 10 mgr; III. — 15 mgr; IV. — 20 mgr;
V. — 25 mgr; VI. — 30 mgr; VII. — 35 mgr; VIII. — 40 mgr.

courbes d'hydrolyse sont encore représentées par des droites, mais les vitesses d'hydrolyse sont plus grandes que pour les deux esters précédemment étudiés et ce n'est que vers la fin de la réaction qu'elles s'inclinent vers l'horizontale.

Quant à la courbe d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat (figure 8), elle a sensiblement l'allure d'une droite, ce qui prouve la grande affinité de la cholinestérase pour cet ester et la faible action inhibitrice de la choline sur le ferment.

Fig. 8



Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure de PrCh par la ChE du sérum de Cheval en fonction de la concentration en substrat, (valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée).

5° *Hydrolyse de mélanges d'ester cholinique et de choline en diverses proportions.*

Dans cette partie de notre travail nous avons étudié des mélanges d'ester cholinique et de choline dans les proportions indiquées ci-après :

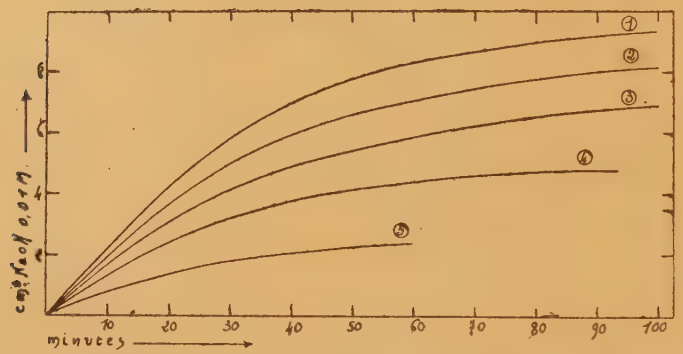
N° des courbes d'hydrolyse enzymatique	1	2	3	4	5	6
Pourcentage en chlorure d'ester cholinique	100	80	60	40	20	0
Pourcentage en chlorure de choline	0	20	40	60	80	100

Nos recherches ont porté tour à tour sur des mélanges :

a) acétylcholine — choline,
b) benzoylcholine — choline,
c) propionylcholine — choline.

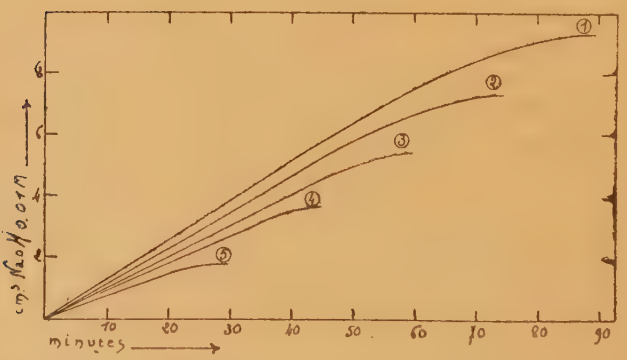
et les résultats obtenus sont représentés par les figures 9, 10 et 11.

Fig. 9



Courbes d'hydrolyse enzymatique de mélanges de chlorures d'ACh et de Choline en diverses proportions

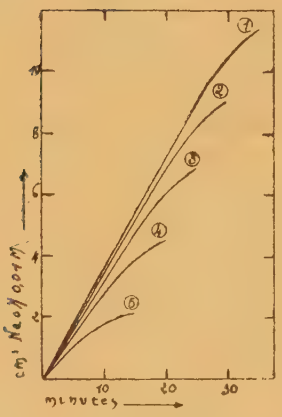
Fig. 10



Courbes d'hydrolyse enzymatique de mélanges de Chlorures de BzCh et de Choline en diverses proportions.

Ces résultats nous laissent entrevoir la possibilité de déterminer le degré de pureté de solutions d'esters choliniques. C'est ce que nous étudierons à la fin du chapitre III.

Fig. 11



Courbes d'hydrolyse enzymatique de mélanges de Chlorures de PrCh et de Choline en diverses proportions.

B) Résultats obtenus par la méthode manométrique de Ammon avec l'appareil de Warburg.

Poursuivant nos recherches par la méthode manométrique de Ammon, nous avons tout d'abord été amenés à calculer le coefficient manométrique de correction du volume gazeux, puis tour à tour nous avons étudié l'action de cholinestérases de différentes sources sur les esters déjà étudiés.

Les courbes d'hydrolyse en fonction du temps (30 minutes) ont été construites toujours d'après les résultats de nos expériences, en portant aux abcisses les temps d'hydrolyse et aux ordonnées les pressions exercées par les volumes gazeux, exprimées en mm. de liquide de Brodie.

Les concentrations en substrat utilisées pour la méthode manométrique sont données par le tableau de la page 68.

1° *Calcul du coefficient manométrique de correction du volume gazeux.*

Les six cuves servant à nos expériences, numérotées de 1 à 6, sont placées côte à côte sur une table de laboratoire. On introduit dans chacune d'elles 2 cm³ d'une solution de sérum de Cheval à 1,25% dans du Ringer bicarbonaté et, dans les cupules

Tableau des concentrations en substrat utilisées pour la méthode manométrique

Substrat en mgr. dans vol. de 2,5 cmᵌ lors de l'essai	ACh	BzCh	PrCh	AMeCh	CbCh
0,4	8,81 × 10^{-4}M ..	6,57 × 10^{-4}M ..	8,18 × 10^{-4}M ..	8,18 × 10^{-4}M ..	
1	2,20 × 10^{-3}M ..	1,64 × 10^{-3}M ..	2,04 × 10^{-3}M ..	2,04 × 10^{-3}M ..	
2	4,40 × 10^{-3}M ..	3,28 × 10^{-3}M ..	4,09 × 10^{-3}M ..	4,09 × 10^{-3}M ..	4,38 × 10^{-3}M ..
3	6,60 × 10^{-3}M ..	4,92 × 10^{-3}M —	6,13 × 10^{-3}M ..	6,13 × 10^{-3}M ..	
4	8,80 × 10^{-3}M ..	6,57 × 10^{-3}M ..	8,18 × 10^{-3}M ..	8,18 × 10^{-3}M ..	
5	1,10 × 10^{-2}M ..	8,21 × 10^{-3}M ..	1,02 × 10^{-2}M ..	1,02 × 10^{-2}M ..	
8	1,76 × 10^{-2}M ..	1,31 × 10^{-2}M ..	1,63 × 10^{-2}M ..	1,63 × 10^{-2}M ..	
10	2,20 × 10^{-2}M ..	1,64 × 10^{-2}M ..	2,04 × 10^{-2}M ..	2,04 × 10^{-2}M ..	
20	4,40 × 10^{-2}M ..	3,28 × 10^{-2}M ..	4,08 × 10^{-2}M ..	4,08 × 10^{-2}M ..	
40	8,80 × 10^{-2}M ..	6,56 × 10^{-2}M ..	8,16 × 10^{-2}M ..	8,16 × 10^{-2}M ..	
80	1,76 × 10^{-1}M ..	1,31 × 10^{-1}M ..	1,63 × 10^{-1}M ..	1,63 × 10^{-1}M ..	
100	2,20 × 10^{-1}M ..	1,64 × 10^{-1}M ..	2,04 × 10^{-1}M ..	2,04 × 10^{-1}M ..	
120	2,64 × 10^{-1}M ..	1,96 × 10^{-1}M ..	2,44 × 10^{-1}M ..	2,44 × 10^{-1}M ..	
200	4,40 × 10^{-1}M ..	3,28 × 10^{-1}M ..	4,08 × 10^{-1}M ..	4,08 × 10^{-1}M ..	

latérales, 0,5 cm³ d'une solution de chlorure d'acétylcholine à 4‰ soit 20 mgr. de substrat.

Après être passé en atmosphère d'azote carbonique, après avoir égalisé les températures des cuves et mélangé intimement le substrat avec la solution sérique, on laisse les réactions se poursuivre pendant 30 minutes.

On lit alors le dégagement gazeux sur chaque manomètre.

Le coefficient manométrique est déterminé par rapport à une hauteur manométrique prise arbitrairement comme étalon. Si nous choisissons les cuves 1 et 6 qui ont donné un même dégagement gazeux, le coefficient manométrique pour la cuve 2 sera :

$$\frac{20}{19{,}8} = 1{,}01$$

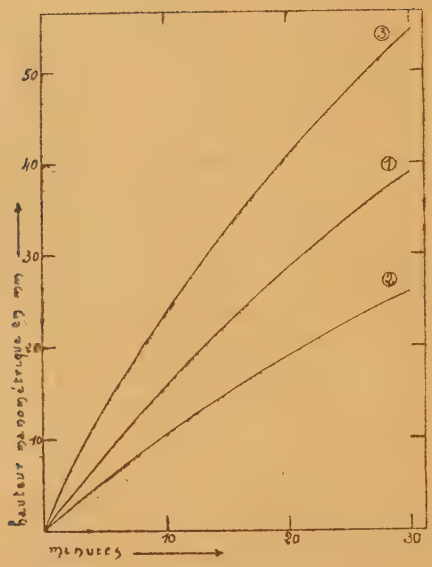
Numéro des cuves	1	2	3	4	5	6
Hauteur manométrique ..	20	19,8	19,6	19,9	20,1	20
Coefficient manométrique.	1	1,01	1,02	1,005	0,995	1

2° *Essais avec la cholinestérase du sérum de Cheval.*

A) *Hydrolyse d'une même quantité des différents esters choliniques.*

Nous avons étudié en premier lieu (figure 12) l'hydrolyse de 20 mgr. de chlorures d'acétylcholine, de propionylcholine, d'acétyl-ß-méthylcholine, de carbaminoylcholine et 20 mgr. de perchlorate de benzoylcholine, ce qui ne modifie que fort peu la concentration de la solution. Comme pour la méthode alcalimétrique, nous avons constaté une activité de la cholinestérase envers les trois premiers esters et une absence totale d'activité envers l'acétyl-ß-méthylcholine et la carbaminoylcholine.

Fig. 12



Courbes d'hydrolyse enzymatique de 20 mgr. de chlorures d'ACh (I), BzCh (II), PrCh (III), par la ChE du sérum de Cheval l'action sur l'AMCh et la CbCh est nul et la courbe se confond avec l'axe des abscisses.

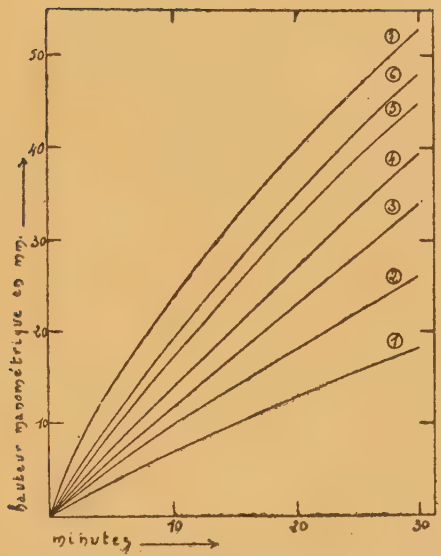
B) *Résultats concernant l'acétylcholine.*

Nos essais ont porté sur des quantités de substrat variant de 0,4 mgr. à 200 mgr. de chlorure d'acétylcholine (1). La figure 13 reproduit les courbes d'hydrolyse en fonction du temps (30 minutes) des différentes quantités d'acétylcholine. La courbe en fonction de la concentration en substrat (figure 14) révèle une activité sans cesse croissante de la cholinestérase sérique avec la quantité d'acétylcholine. Néanmoins, après une élévation rapide de cette activité dont le maxima se situe entre 12 et 20 mgr., la courbe ne s'élève plus que très lentement et pour une concentration en substrat 10 fois supérieure (20 à 200 mgr.), l'activité cholinestérasique n'augmente que de 20%.

---

(1) Dans un volume total de 2,5 cm³, soit des concentrations moléculaires allant de $8{,}81 \times 10^{-4}$ M à $4{,}40 \times 10^{-1}$ M (voir tableau p. 68).

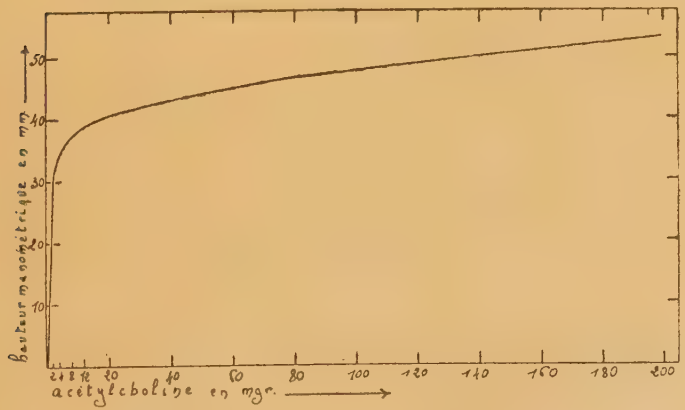
Fig. 13



Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure d'ACh par la ChE du sérum de Cheval en fonction du temps

I. — 0,8 mgr; II. — 2 mgr; III. — 4 mgr; IV.— 12 mgr; V. — 60 mgr; VI. — 100 mgr; VII. — 200 mgr

Fig. 14

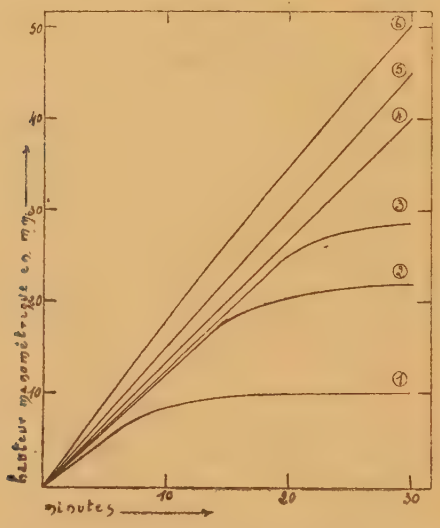


Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure d'ACh par la ChE du sérum de Cheval en fonction de la concentration en substrat, indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

c) *Résultats concernant la benzoylcholine.*

Le chlorure de benzoylcholine étant très peu soluble dans l'eau, il ne nous a pas été possible de dépasser la concentration de 1% et, même à cette concentration, il faut maintenir la solution à une température voisine de 38°, car il se produit une recristallisation à la température ordinaire. C'est la raison pour laquelle nos essais ont été limités entre 0,4 mgr. et 5 mgr. De plus, les résultats reproduits sur la figure 15 ont été obtenus avec une

Fig. 15

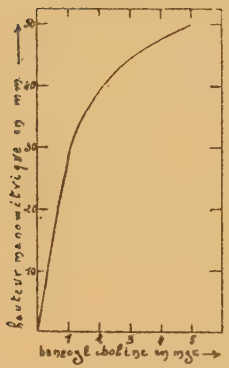


Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure de BzCh par la ChE du sérum de Cheval en fonction du temps

I. — 0,4 mgr.; II. — 0,8 mgr.; III. — 1 mgr.; IV. — 2 mgr.; V. — 3 mgr.; VI. — 5 mgr.

solution sérique à 4% dans du Ringer bicarbonaté, le sérum utilisé ayant manifesté une activité cholinestérasique trop faible. Comme pour l'acétylcholine, nous avons noté (figure 16) une augmentation de l'activité cholinestérasique avec la concentration en substrat, mais cette méthode ne nous a pas permis de pousser nos investigations au delà de 5 mgr.

Fig. 16

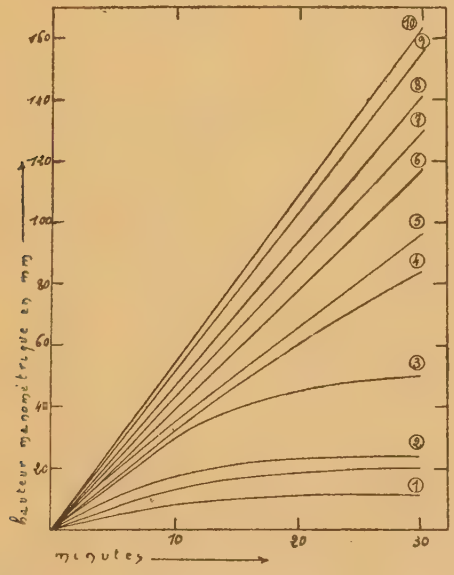


Courbe d'hydrolyse énzymatique de chlorure de BzCh par la ChE du sérum de Cheval en fonction de la concentration en substrat, indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

D) *Résultats concernant la propionylcholine.*

Nous avons pu obtenir avec cet ester plus soluble que la benzoylcholine des solutions à 20% de chlorure de propionylcho-

Fig. 17

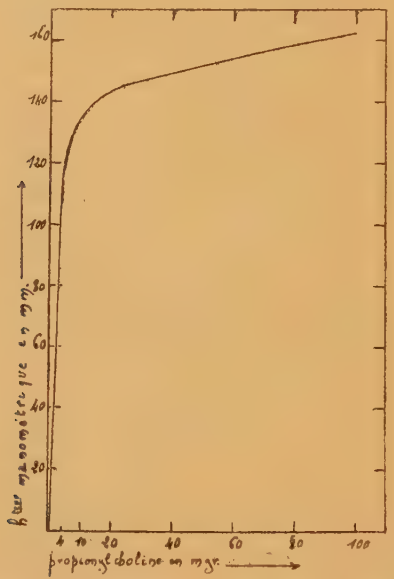


Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure de PrCh par la ChE du sérum de Cheval en fonction du temps
I. — 0,4 mgr.; II. — 1 mgr.; III. — 2 mgr.; IV. — 3 mgr.; V. — 4 mgr.; VI. — 5 mgr.; VII. — 8 mgr.; VIII. — 16 mgr.; IX. — 60 mgr.; X. — 100 mgr.

line, ce qui nous a permis d'en étudier l'hydrolyse de 0,4 mgr. à 100 mgr.

La figure 17 reproduit les résultats obtenus avec une solution sérique à 4%. Comme pour les deux esters précédents, nous constatons, d'après la courbe en fonction de la concentration en propionylcholine (figure 18), une augmentation de l'activité cholinestérasique avec la concentration en substrat.

Fig. 18



Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure de PrCh par la ChE du sérum de Cheval en fonction de la concentration en substrat, indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

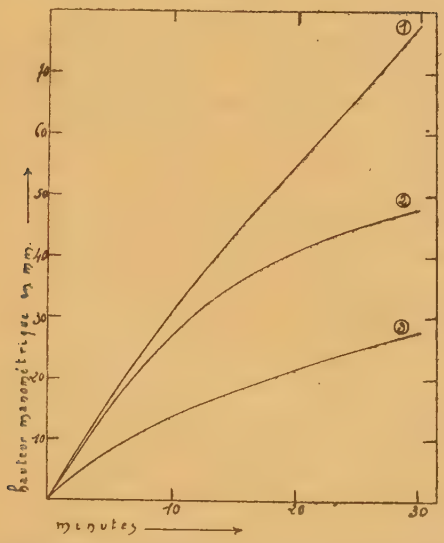
3° *Essais avec la cholinestérase des érythrocytes.*

A) *Hydrolyse d'une même quantité des différents esters choliniques.*

Comme pour la cholinestérase du sérum, nous avons étudié en premier lieu l'hydrolyse d'une même quantité (2 mgr.) de chlorures d'acétylcholine, de benzoylcholine, de propionylcholine, d'acétyl-6-méthylcholine et de carbaminoylcholine. Nous avons constaté une activité de cet enzyme vis-à-vis de l'acétylcholine, de la propionylcholine et de l'acétyl-6-méthylcholine et une absence totale d'activité envers la benzoylcholine et la carba-

minoylcholine (figure 19).

Fig. 19



Courbes d'hydrolyse enzymatique de 2 mgr. de chlorures d'ACh (I), PrCh (II), AMeCh (III) par la ChE des érythrocytes de Cheval, l'action sur la BzCh et la CbCh est nulle et la courbe se confond avec l'axe des abscisses.

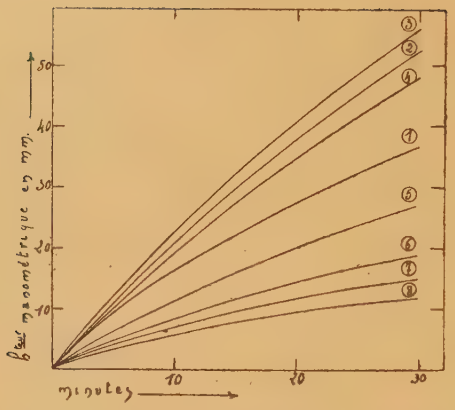
La différence d'activité de la cholinestérase globulaire envers l'acétylcholine et l'acétyl-δ-méthylcholine est de 64%, celle envers l'acétylcholine et la propionylcholine n'est que de 25,6%. Il existe donc des différences très nettes entre ces deux enzymes : la cholinestérase du sérum est active sur la benzoylcholine et inactive sur l'acétyl-δ-méthylcholine, la cholinestérase des érythrocytes est inactive sur la benzolycholine et active sur l'acétyl-δ-méthylcholine Le premier enzyme présente une activité vis-à-vis de la propionylcholine supérieure à celle vis-à-vis de l'acétylcholine. Le deuxième enzyme au contraire a une activité inverse, cette dernière étant plus grande envers l'acétylcholine qu'envers la propionylcholine.

B) *Résultats concernant l'acétylcholine.*

Nos essais ayant porté sur des quantités d'acétylcholine riant de 0,4 mgr. à 200 mgr. (1) (figure 20), nous avons constaté

(1) Pour un volume total de 2,5 cm³, soit des concentrations moléculaires allant de $8{,}81 \times 10^{-4}$ M à $4{,}40 \times 10^{-1}$ M (voir tableau p. 68).

Fig. 20

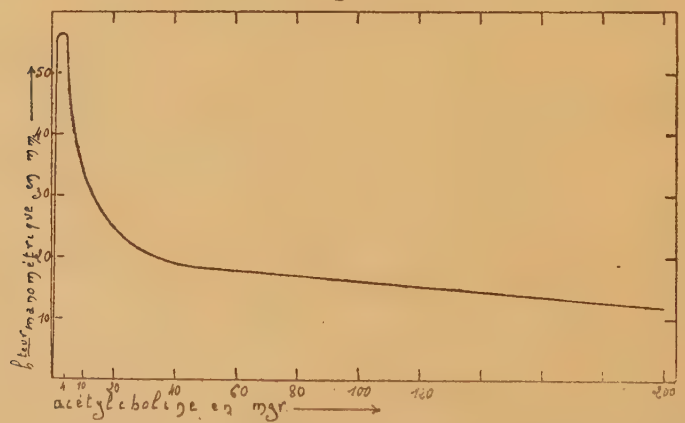


Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure d'ACh par la ChE des érythrocytes du Cheval en fonction du temps

I. — 1,2 mgr.; II. — 3 mgr.; III. — 5 mgr.; IV. — 8 mgr.; V. — 16 mgr.; VI. — 40 mgr.; VII. — 120 mgr.; VIII. — 200 mgr.

un maximum d'activité pour des concentrations de 3 à 5 mgr. d'acétylcholine, puis une inhibition qui, tout d'abord rapide (puisque pour une concentration de 40 mgr. d'acétylcholine elle atteint 66%) diminue par la suite beaucoup plus lentement pour atteindre 78,5% pour une concentration de 200 mgr. de substrat (figure 21).

Fig. 21



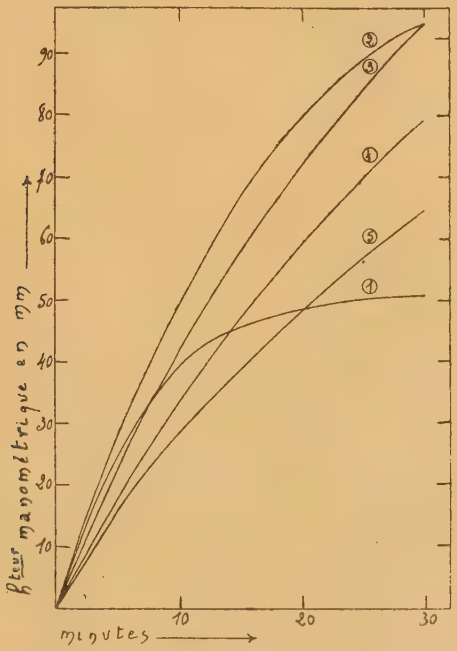
Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure d'ACh par la ChE des érythrocytes de Cheval en fonction de la concentration en substrat indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

c) *Résultats concernant la propionylcholine.*

L'activité cholinestérasique des globules en notre possession s'étant révélée trop faible, nous avons utilisé pour ces essais une solution de globules hémolysés au 1/5e. Le sel de propionylcholine employé a été le perchlorate.

La figure 22 représente les différentes courbes d'hydrolyse.

Fig. 22



Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de perchlorate de PrCh par la ChE des érythrocytes de Cheval - en fonction du temps.

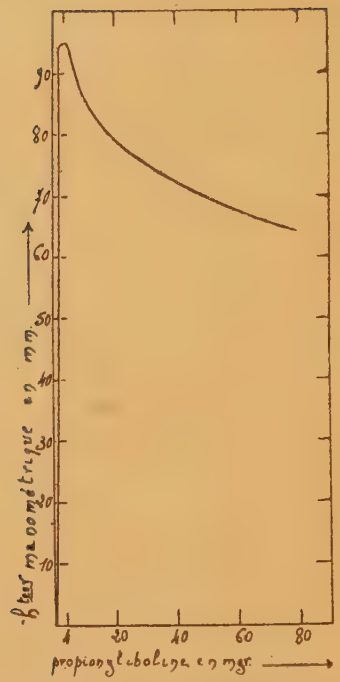
I. — 0,8 mgr; II. — 2 mgr; III. — 4 mgr; IV. — 20 mgr; V. — 80 mgr.

Nous avons constaté (figure 23) un maximum d'action pour de faibles concentrations en substrat (2 à 4 mgr.) et une inhibition moins forte par excès de substrat (24% pour une concentration de 40 mgr. de propionylcholine) que dans le cas de l'acétylcholine.

d) *Résultats concernant l'acétyl-β-méthylcholine.*

Nous avons utilisé la même solution globulaire au 1/5e que pour la propionylcholine et nos essais ont porté sur des quantités

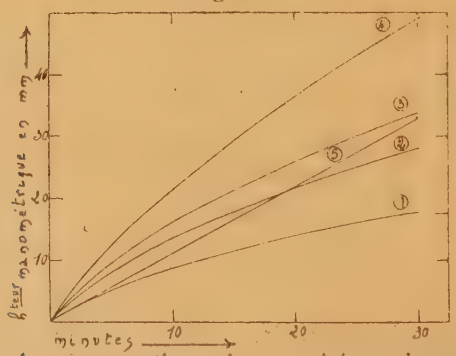
Fig. 23



Courbe d'hydrolyse enzymatique de perchlorate de PrCh par la ChE des érythocytes de Cheval en fonction de la concentration en substrat indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

d'acétyl-β-méthylcholine variant de 0,4 mgr. à 200 mgr. (figure

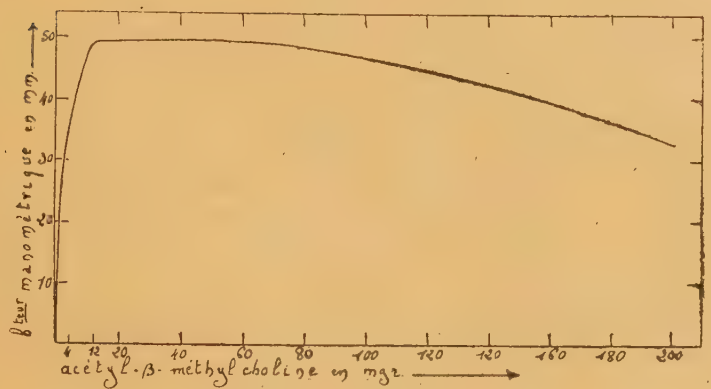
Fig. 24



Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure d'AMeCh par la ChE des érythrocytes de Cheval en fonction du temps I. — 0,8 mgr.; II. — 2 mgr.; III. — 4 mgr.; IV. — 12 mgr.; V. — 200 mgr.

24). Nous avons observé (figure 25) un maximum d'activité

Fig. 25



Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure d'AMeCh par la ChE des érythrocytes de Cheval en fonction de la concentration en substrat, indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

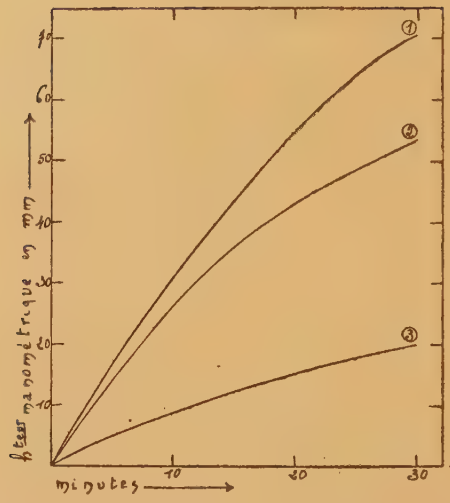
pour des concentrations légèrement plus élevées que pour les deux esters précédents (12 mgr.), cette activité maxima se maintenant sensiblement la même pour des concentrations de l'ordre de 50 et même 60 mgr. de substrat. L'inhibition légère à 100 mgr., puisqu'elle n'atteint que 4%, n'est guère sensible qu'à 200 mgr. où elle atteint 32%.

4° *Essais avec la cholinestérase du cerveau.*

A) *Hydrolyse d'une même quantité des différents esters choliniques.*

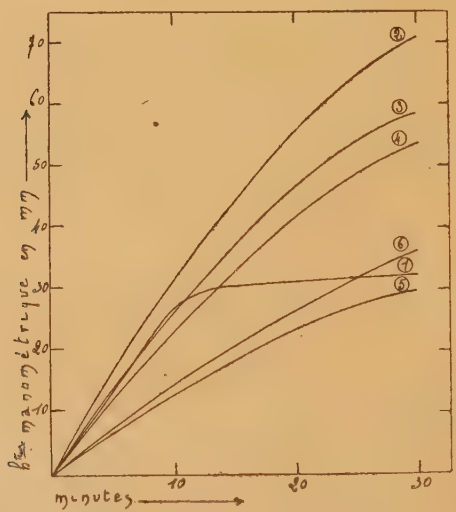
Les résultats sont analogues à ceux obtenus avec la cholinestérase des érythrocytes : activité de l'enzyme envers l'acétylcholine, la propionylcholine et l'acétyl-ẟ-méthylcholine, absence d'activité vis-à-vis de la benzoylcholine et de la carbaminoylcholine (figure 26).

Fig. 26



Courbes d'hydrolyse enzymatique de 2 mgr. de chlorures d'ACh (I), PrCh (II), AMeCh (III) par la ChE du cerveau de Mouton. (l'effet sur la BzCh et la CbCh est nul et la courbe se confond avec l'axe des abscisses).

Fig. 27



Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure d'ACh par la ChE du cerveau de Mouton en fonction du temps
I. — 0,8 mgr.; II. — 2 mgr.; III. — 12 mgr.; IV. — 20 mgr.;
V. — 120 mgr.; VI. — 200 mgr.

La différence d'activité de la cholinestérase des globules envers l'acétylcholine et l'acétyl-ß-méthylcholine est de 64%, celle envers l'acétylcholine et la propionylcholine n'est que de 25,6%.

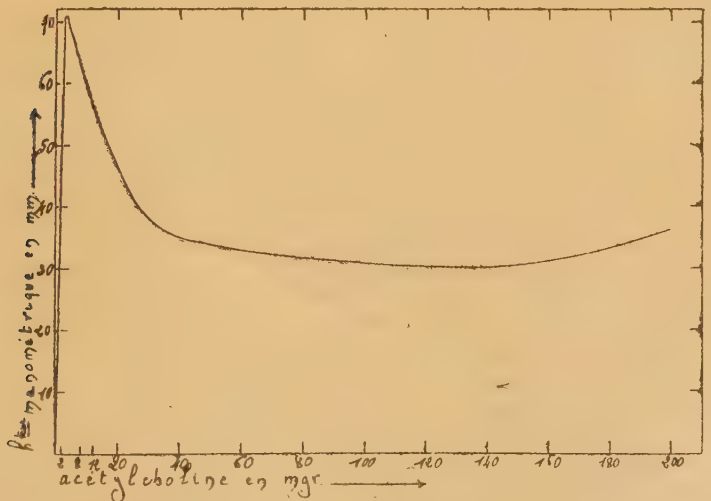
En comparant ces résultats, nous constatons une activité identique de ces enzymes envers la propionylcholine (24 à 25,6%), mais une activité plus faible de la cholinestérase du cerveau envers l'acétyl-ß-méthylcholine (71% et 64%, soit près de 10%).

B) *Résultats concernant l'acétylcholine.*

Les résultats sont identiques à ceux obtenus avec la cholinestérase des érythrocytes : maximum d'action envers de faibles concentrations de substrat (2 à 4 mgr.), puis inhibition par excès de substrat. Toutefois cette diminution de l'activité de l'enzyme est moins importante et moins rapide que pour la cholinestérase globulaire.

Si nous examinons la courbe d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat (figure 28), nous constatons entre 40

Fig. 28



Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure d'ACh par la ChE du cerveau de Mouton en fonction de la concentration en substrat indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

et 120 mgr. une inhibition peu sensible de l'activité enzymatique ; puis au delà de 120 mgr. et jusqu'à 200 mgr. la courbe

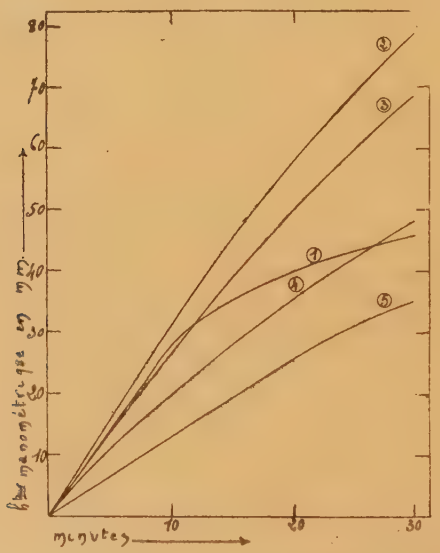
s'élève à nouveau, quoique légèrement, révélant ainsi un renouveau d'activité en fonction de la concentration en acétylcholine.

Cette reprise d'activité, surprenante au premier abord, s'explique aisément en songeant que, lors de la préparation de notre suspension cérébrale, nous avons prélevé obligatoirement avec la substance même du cerveau une quantité appréciable de plasma sanguin contenant de la cholinestérase sérique dont l'influence activante ne se fait sentir que pour de fortes concentrations en substrat, c'est-à-dire lorsque la cholinestérase du cerveau possède son activité minimum.

c) *Résultats concernant la propionylcholine.*

Les résultats (figure 29 et 30) sont analogues à ceux observés en présence de cholinestérase globulaire.

Fig. 29



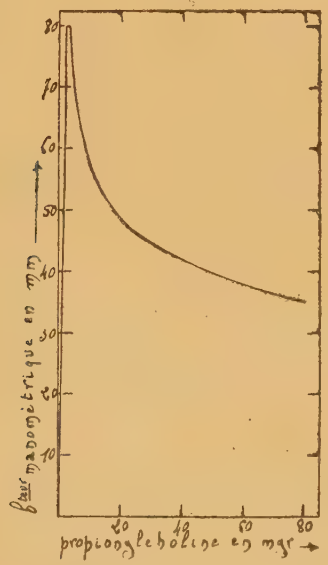
Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes de chlorure de PrCh par la ChE du cerveau de Mouton en fonction du temps.

I. — 0,8 mgr.; II. — 2 mgr.; III. — 4 mgr.; IV. — 20 mgr.; V. — 80 mgr.

D) *Résultats concernant l'acétyl-β-méthylcholine.*

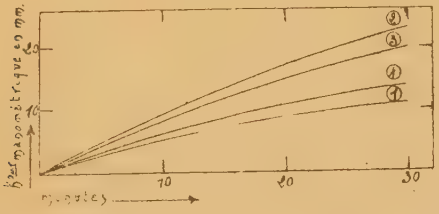
Les résultats (figures 31 et 32) sont également identiques à ceux observés en présence de cholinestérase globulaire.

Fig. 30



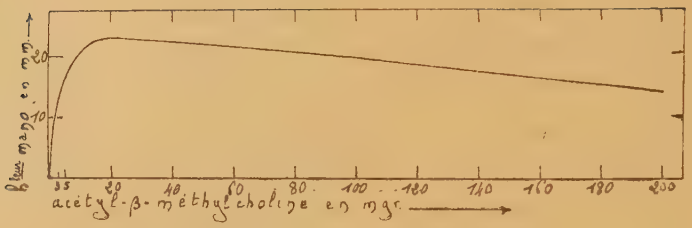
Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure de PrCh par la ChE du cerveau de Mouton en fonction de la concentration en substrat. indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

Fig. 31



Courbes d'hydrolyse enzymatique de quantités croissantes d'AMeCh par la ChE du cerveau de Mouton en fonction du temps.
I. — 1,2 mgr.; II. — 20 mgr.; III. — 100 mgr.; IV. — 200 mgr.

Fig. 32



Courbe d'hydrolyse enzymatique de chlorure d'AMeCh par la ChE du cerveau de Mouton en fonction de la concentration en substrat. indiquant la valeur de l'hydrolyse en 20 minutes pour chaque concentration étudiée.

Le sel que nous avons utilisé est le chlorure d'acétyl-ß-méthylcholine.

5° *Conclusions.* — Les résultats de ces recherches confirment et précisent ceux déjà obtenus par Stedman, Stedman et White en 1933, Alles et Hawes en 1940, Mendel et Rudney, Zeller et Bisseger en 1943, Langemann en 1944 et Augustinsson en 1945.

Un tableau synthétisant tous ces résultats se trouve au début du Chapitre III.

Nous confirmons donc pleinement les différences de comportement de la cholinestérase sérique et des cholinestérases globulaire et nerveuse vis-à-vis des divers esters choliniques ainsi que par rapport aux concentrations de substrat.

CHAPITRE III

Essais d'Application pratique concernant la diagnose des esters choliniques et leur titration quantitative

1° Essai de diagnose des esters choliniques précédemment étudiés.

Une observation attentive des activités des cholinestérases de différentes sources sur les quelques esters choliniques étudiés précédemment (figures 12 et 19) nous a permis d'entrevoir la possibilité d'un procédé de diagnose de ces esters.

Les résultats reportés sur le tableau de la page 88 nous permettent d'identifier d'une manière certaine :

— la benzoylcholine, hydrolysée par la cholinestérase sérique et inattaquée par la cholinestérase des globules et du cerveau ;

— l'acétyl-β-méthylcholine inattaquée par la cholinestérase sérique et hydrolysée par la cholinestérase des globules et du cerveau.

L'acétylcholine et la propionylcholine, étant toutes les deux hydrolysées par les cholinestérases sérique et globulaire, il n'est pas possible de les identifier par cette méthode purement enzymatique. Mais un simple recours au sel de Reinecke (1) permet leur différenciation (2).

Quant à la carbamoylcholine stable en présence de ces différentes cholinestérases et à la choline qui n'a pas à subir d'hydrolyse, il faudra également utiliser le sel de Reinecke pour les identifier.

Bien entendu, une telle méthode ne vaut de façon formelle

(1) Le sel de Reinecke se présente sous la forme de cristaux brillants d'un rouge violacé intense, devenant plus clairs et rosés par le broyage, assez solubles dans l'eau froide (4 gr. environ pour 100 cm.), beaucoup plus solubles dans l'eau chaude. Sa solution ne peut être conservée à froid que pendant un petit nombre de jours.

Le sel de Reinecke n'a rien de spécifique, puisque de nombreux auteurs ont étudié les reineckates minéraux simples ou complexes et les reineckates des bases organiques (Christensen notamment) et qu'il a été proposé par Rosenthaler pour la recherche microchimique des alcaloïdes et de quelques amino-alcools. Mais c'est un complément utile et souvent indispensable.

(2) Il est évidemment aussi possible d'identifier l'acide estérifiant (ac. acétique - acide propionique, etc.) après hydrolyse alcaline par leurs réactions classiques.

que dans le cadre des esters choliniques que nous avons étudiés et ne peut être appliquée pour d'autres esters que sous réserve d'une mise au point préalable analogue à celle que nous avons faite ci-dessus.

Technique :

1° **Action enzymatique.**

Deux cuves de Warburg sont nécessaires. Dans l'une, on place 2 cm^3 de la solution de cholinestérase sérique et dans l'autre le même volume de la solution de cholinestérase globulaire (1). Dans chaque cupule latérale, on dispose 0,5 cm^3 de la solution à identifier (2) et une fois les préparatifs terminés, on laisse la réaction se poursuivre pendant 10 minutes, au bout desquelles on constate la présence ou l'absence d'hydrolyse.

2° **Recherches microchimiques.**

a) Par le réactif de Florence.

I. — *Examen de la solution sans hydrolyse préalable*

Sur une lame porte-objet on dépose tour à tour : une goutte de la solution à identifier et une goutte de réactif de Florence. On procède à l'examen microscopique. On aperçoit alors des gouttelettes brunes se transformer rapidement en des cristaux jaunes ou bruns, ou en lamelles allongées, rappelant la forme d'une lame de parquet, habituellement réunies en croix ou en étoile, quelquefois bifurquées à leurs extrémités. Ces cristaux sont instables et se transforment au bout d'un certain temps relativement court (20 minutes à 1 heure) en gouttelettes brunâtres. Cette réaction, qui est celle du périodure de choline, est spécifique de la choline. Les esters de la choline ne donnent que des gouttelettes brunes, mais pas de cristaux; ils en donnent après hydrolyse. Seule, parmi les esters, la carbaminoylcholine donne naissance à des cristaux en forme de longues aiguilles se développant petit à petit et ne se transformant pas en gouttelettes brunâtres comme pour la choline.

II. — *Examen de la solution après hydrolyse préalable à froid par NaOH N*

Sur une lame porte-objet, on dépose tour à tour :

(1) Solution de sérum de Cheval à 1,25% en Ringer bicarbonaté; hématies de Cheval hémolysyées à 1/10e. On peut aussi utiliser une suspension de cerveau (substance grise) de Mouton à 1/40e en Ringer bicarbonaté à la place des hématies.

(2) Utiliser une solution d'ester cholinique à 2% en Ringer bicarbonaté.

— une goutte de la solution à identifier,
— une goutte de NaOH N,
— une goutte de HCl N,
— une goutte de réactif de Florence.

On obtient alors des cristaux typiques de Florence avec la choline, l'acétylcholine, la benzoylcholine et la propionylcholine.

Mais carbaminoylcholine et acétyl-β-méthylcholine font exception et ne réagissent pas de la même manière. La carbaminoylcholine en effet donne naissance à des cristaux en aiguilles très longues et persistantes, identiques à ceux obtenus sans action préalable de NaOH N. Quant à l'acétyl-β-méthylcholine, elle donne bien de fines gouttelettes brunâtres, mais pas de cristaux. Cette différence provient sans doute du fait que l'acétyl-β-méthylcholine étant un ester de la méthylcholine ne libère pas de la choline à l'hydrolyse, mais un homologue supérieur de la choline.

En conclusion, le simple essai au réactif de Florence (apparition de cristaux ou de gouttelettes brunâtres) sans hydrolyse ou après hydrolyse, permet déjà dans une certaine mesure de discerner la présence de choline ou d'ester cholinique et une certaine détermination qualitative.

B. — Par le sel de Reinecke.

On utilise une solution saturée faite avec du sel de Reinecke Hoffmann La Roche dans l'eau distillée.

Sur une lame porte-objet, on dépose une goutte de la solution saturée de sel de Reinecke. On met en contact par inclinaison de la lame et on examine au microscope.

Si l'action enzymatique s'est révélée positive avec la cholinestérase sérique et avec la cholinestérase globulaire, il ne peut s'agir (du moins parmi les esters que nous avons étudiés) que d'acétylcholine ou de propionylcholine. L'examen microscopique révèlera alors pour l'acétylcholine un Reineckate cristallisé en forme de losanges volumineux, isolés, portant aux extrémités de leur petit diamètre un renflement arrondi, et pour la propionylcholine au contraire de tout petits cristaux losangiques isolés ou disposés en rosace.

Si l'action enzymatique s'est révélée négative en présence des deux cholinestérases, il ne peut s'agir que de choline ou de car-

		Choline	ACh	BzCh	PrCH	AMCh	Cb
Cholinestérase du sérum		—	+	+	+	—	—
Cholinestérase des globules		—	+	—	+	+	—
Cholinestérase du cerveau		—	+	—	+	+	—
Réactif de Florence	I. Sans action prélable de NaOH N ...	Cristaux	Globules	Globules	Globules	Globules	Cristaux caractéristiques en aiguilles longues et persistantes.
	II. Après action prélable de NaOH N ...	Cristaux	Cristaux	Cristaux	Cristaux	Globules	Cristaux caractéristiques en aiguilles longues et persistantes.
Sel de Reinecke		Petits cristaux peu nets	Gros cristaux losangiques		Petits cristaux losangiques		Cristaux en aiguilles disposées en étoile.

baminoylcholine. L'examen microscopique révèlera alors pour la choline de nombreux petits cristaux peu nets au milieu d'une masse confuse, tandis que pour la carbaminoylcholine, nous nous trouverons en présence de longues aiguilles disposées en étoile à très nombreuses branches, fines et enchevêtrées.

Une simple lecture du tableau (page 88) résumant les différents résultats observés, permet la diagnose de la choline et des quelques esters choliniques étudiés.

2° Essai de dosage enzymatique d'un ester cholinique.

La diagnose de l'ester étant réalisée, il nous a semblé possible de faire dans ses solutions, en examinant les courbes d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat, un dosage par simple lecture sur une courbe étalon de la quantité de substrat correspondant à l'activité cholinestérasique, au bout de 30 minutes, exprimé en mm. de liquide de Brodie. Dans le cas d'un ester hydrolysable par la cholinestérase sérique, on pourra utiliser aussi bien la méthode alcalimétrique.

Chaque dosage comprendra donc deux parties bien distinctes : l'établissement de la courbe étalon d'une part, la détermination de l'activité cholinestérasique du ferment en présence de la quantité inconnue de substrat, d'autre part.

De plus, selon la source de cholinestérase utilisée et selon l'ester à doser, nous aurons à examiner le cas où il n'existe pas d'inhibition par excès de substrat (dosages d'acétylcholine, de benzoylcholine, de propionylcholine par la cholinestérase du sérum) et le cas où cette inhibition se produit (dosages d'acétylcholine, de propionylcholine, d'acétyl-β-méthylcholine par la cholinestérase des érythrocytes ou du cerveau). Aussi conviendra-t-il d'opérer dans la *zone sensible* où l'hydrolyse croît rapidement en fonction de la concentration d'ester, ce qui est indidiqué par la courbe étalon. Il est utile pour cela de faire plusieurs déterminations sur des quantités croissantes de la solution à doser.

1° *Dosage au moyen de la cholinestérase sérique.*

Nous avons tout d'abord procédé dans le cas de l'acétylcholine, par exemple, à la construction de la courbe étalon, comme il a été indiqué précédemment (figure 14).

Nous avons utilisé comme solution à titrer une ampoule d' « Acécoline » des laboratoires Lematte et Boinot contenant

200 mgr. de chlorure d'acétylcholine par cm³. D'une part, nous avons pris 0,5 cm³ et 0,1 cm³ de cette solution, et d'autre part 0,25 cm³. d'une solution d'Acécoline au 1/10e, volumes correspondant respectivement à 100 mgr., à 20 mgr. et à 5 mgr. de chlorure d'acétylcholine.

Ce dosage, effectué par la méthode alcalimétrique, a donné les résultats suivants :

Quatre solutions de chlorure d'acétylcholine nous ont alors

Essai N°	Quantité trouvée en mgr.	Quantité théorique en mgr.	Erreur %
I	98	100	2
II	20	20	0
III	5	5	0

alors été proposées et le tableau ci-dessous reproduit les résultats que nous avons trouvés.

Essai N°	Quantité trouvée en mgr.	Quantité théorique en mgr.	Erreur %
I	3	2,8	7,1
II	35	34	2,9
III	5	5	0
IV	20	22	9

2° *Dosage au moyen de la cholinestérase du cerveau.*

Nous avons dans ce cas utilisé la méthode manométrique. Pour ce faire, nous avons pris comme exemple le bromure d'acétyl-6-méthylcholine. Nous avons construit d'abord la courbe étalon d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat.

Puis, utilisant une ampoule d' « Hypotan » des laboratoires

Lematte et Boinot contenant 200 mgr. de bromure d'acéty[1]-ß-méthylcholine par cm³, nous en avons pris d'une part 0,5 cm³, soit 100 mgr. de bromure d'acétyl-ß-méthylcholine. D'autre part nous avons effectué un deuxième essai avec 0,1 cm³ d'une solution au 1/10ᵉ correspondant à 2 mgr. de bromure d'acétyl-ß-méthylcholine. Ce dosage a donné les résultats suivants :

Essai N°	Quantité trouvée en mgr.	Quantité théorique en mgr.	Erreur %
I	100	100	0
II	1,9	2	5

Trois solutions de bromure d'acétyl-ß-méthylcholine nous ont été proposées et le tableau ci-après indique les résultats que nous avons trouvé.

Essai N°	Quantité trouvée en mgr.	Quantité théorique en mgr.	Erreur %
I	33	36	9
II	15	16	6,2
III	4	4	0

Signalons que lorsqu'on se trouve en présence d'une inhibition par excès de substrat, deux solutions correspondant à des quantités différentes de substrat sont toujours possibles selon que les chiffres indiquant l'activité cholinestérasique se trouvent d'un côté ou de l'autre du maximum d'activité. Il est par suite nécessaire, afin de déterminer cette position, d'effectuer un dosage sur une solution très diluée d'ester cholinique.

Si l'on se trouve en présence d'une concentration élevée, l'activité cholinestérasique augmentera avec une dilution de la solution mère.

Si au contraire on se trouve en présence d'une faible concentration, une dilution de la solution mère rendra nulle l'activité de la cholinestérase.

3° *Essai de détermination du degré d'altération par hydrolyse spontanée des solutions d'esters choliniques.*

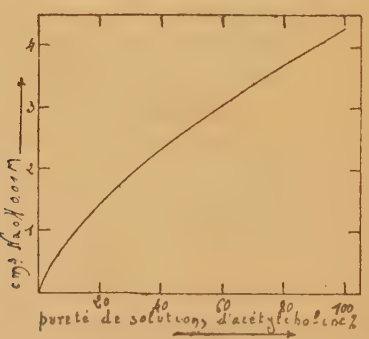
Après avoir étudié par la méthode alcalimétrique l'hydrolyse de mélanges d'ester cholinique et de choline en diverses proportions, nous avons pensé qu'il serait possible de déceler le degré d'altération d'une solution cholinique par la modification de la courbe d'hydrolyse obtenue par la cholinestérase.

C'est ainsi que pour chacun des trois esters étudiés (acétylcholine, benzoylcholine et propionylcholine) nous avons été amené à construire une courbe donnant directement le pourcentage de pureté de la solution cholinique considérée. Pour cela nous avons porté aux ordonnées le nombre de centimètres cubes de soude 0,01 M consommés et aux abcisses le pourcentage de pureté de la solution cholinique considérée, les différents points de cette courbe correspondant aux différentes activités cholinestérasiques, au bout de 30 minutes, en présence de mélanges d'ester cholinique, choline en diverses proportions, les prises d'essai étant de 10 cm³. de solution à 2 p. 1000, soit 20 milligrs. L'enzyme était apporté par 1 cm³. de sérum de Cheval.

Les figures 33, 34 et 35 permettent la détermination graphique du degré d'hydrolyse de solutions d'acétylcholine, de benzoylcholine et de propionylcholine par la méthode alcalimétrique.

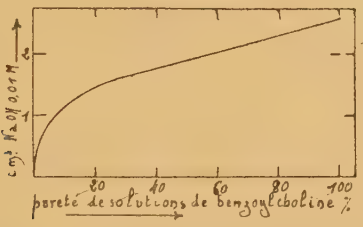
Mais l'activité fermentaire variant notablement selon le sérum utilisé comme source d'enzyme, il est nécssaire de faire avec le même échantillon de sérum la courbe de détermination alcalimétrique de l'hydrolyse en 30 minutes de mélanges en diverses

Fig. 33



proportions de l'ester étudié et de choline, ce qui complique singulièrement la méthode.

Fig. 34



Toutefois, l'expérience montre que dans la pratique, il n'est pas absolument nécessaire de tracer la courbe étalon d'altération des solutions choliniques; il suffit d'opérer le dosage

Fig. 35

enzymatique que l'on poursuit jusqu'à l'hydrolyse totale, sachant que 1 cm³ de NaOH 0,01 M correspond à l'hydrolyse de 1,8 mgr. de chlorure d'acétyl-choline. Il est alors indispensable de tenir compte de l'acidité de la solution, dûe à l'hydrolyse spontanée, et qui est déterminée en même temps au début du dosage par neutralisation à la soude 0,01 M avant l'addition du ferment.

C'est ainsi que nous nous sommes proposé de déterminer le degré d'altération de trois solutions acétylcholiniques à 2 p. 1000.

L'échantillon I était constitué par une prise d'essai de 10 cm³ d'une solution de chlorure d'acétylcholine préparée depuis trois mois et abandonnée à la température du laboratoire.

L'échantillon II, par 10 cm³ de la même solution portée pen-

dant 5 minutes à l'ébullition, ce qui a pour effet d'en augmenter l'hydrolyse spontanée.

L'échantillon III, par 10 cm³ de la même solution portée pendant 10 minutes à l'ébullition. Dans ces deux derniers cas on ramenait au volume primitif après l'ébullition, par addition d'eau distillée bouillie.

Les résultats que nous avons obtenus sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Résultats obtenus sur 10 cm³ d'une solution de chlorure d'acétylcholine	Degré d'hydrolyse trouvé %
ECHANTILLON I	
Solution vieille de 3 mois	6,25 %
ECHANTLLON II	
Solution portée pendant 5 minutes à l'ébullition	12,5 %
ECHANTILLON III	
Solution portée pendant 10 minutes à l'ébullition	30 %

Conclusion

Les recherches consignées dans ce travail ont eu essentiellement pour but la diagnose et le dosage enzymatique de quelques esters de la choline au moyen des cholinestérases.

Pour situer ces recherches, nous avons préalablement donné un aperçu de nos connaissances sur la choline et sur quelques-uns de ses esters que nous avons utilisés. Nous nous sommes également arrêtés à l'étude des cholinestérases, en insistant plus particulièrement sur la spécificité et les différents types de ces ferments, ainsi que sur les méthodes de détermination de l'activité cholinestérasique.

Puis, après une description détaillée des méthodes ayant servi à nos recherches (méthode alcalimétrique selon E. Stedmann et A.-C. White, modifiée par D. Vincent, G. Segonzac et Mlle de Prat en titration discontinue et méthode manométrique de R. Ammon à l'appareil de Warburg), nous avons rapporté les résultats de nos investigations sur les activités des cholinestérases sérique, globulaire et cérébrale en fonction de concentrations de plus en plus élevées d'acétylcholine, de benzoylcholine, de propionylcholine, d'acétyl-β-méthylcholine et de carbaminoylcholine.

De ces recherches nous dégagerons plusieurs conclusions importantes.

Confirmant en particulier les données établies par B. Mendel et son école, nous avons montré que l'acétylcholine est hydrolysée par les trois cholinestérases étudiées (sérum, hématies, cerveau); il en est de même de la propionylcholine.

Par contre, la benzoylcholine hydrolysée par la cholinestérase du sérum ne l'est pas par les cholinestérases du cerveau et des hématies, tandis que l'acétyl-β-méthylcholine n'est hydrolysée que par les cholinestérases des hématies et du cerveau et que la carbaminoylcholine ne l'est par aucune des trois.

Nous notons d'autre part, que l'hydrolyse de l'acétylcholine, de la benzoylcholine et de la propionylcholine par la cholinestérase du sérum augmente sa vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat, tandis que, dans le cas de la cholinestérase globulaire ou nerveuse, l'activité vis-à-vis de l'acétylcholine et de l'acétyl-β-méthylcholine, maxima pour les faibles concentrations, est inhibée par un excès de substrat.

Ces données peuvent permettre, dans le cadre des esters choliniques que nous avons étudiés (et pour les autres sous réserve de mise au point indispensable) une méthode de diagnose nouvelle de ces esters par recherche de l'action de la cholinestérase du sérum, des hématies et du cerveau et un dosage enzymatique de ces esters en comparaison avec des étalons de concentration connue.

Une méthode originale est apportée pour la diagnose des esters choliniques, combinant l'emploi de la réaction de Florence et du sel de Reinecke (apparition ou non de cristaux, leur forme, etc.) avec l'étude enzymatique au moyen des cholinestérases.

La diagnose étant faite, un dosage enzymatique peut être pratiqué. Nos essais nous ont montré que les résultats sont satisfaisants (erreurs ne dépassant pas 10%), à condition d'être dans la zone sensible de concentration.

Enfin, cette méthode permet une détermination de l'altération des solutions d'esters choliniques sous l'influence de l'hydrolyse spontanée en se référant à des courbes étalons d'hydrolyse faites à partir de mélanges d'esters choliniques et de choline.

Une dernière conclusion concernera enfin l'avenir de cette méthode. En effet, les recherches qui ont été rapportées dans ce travail sur les cholinestérases et les esters choliniques, doivent pouvoir être réalisées avec d'autres enzymes et d'autres esters

biologiquement hydrolysables. Déjà dans l'application que nous en avons faite, elle est susceptible de rendre d'utiles services tant dans le contrôle des médicaments que dans l'industrie pharmaceutique.

Le Président de la Thèse :
VINCENT.

Vu : *Le Doyen :*
CALVET.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 31 Janvier 1949.
Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :
DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abderhalden (E.) und Paffrath (H). — Beitrag zur Frage der Inkret-Hormon Wirkung des Cholins auf die motorischen Funktionen des Verdauungskanals. V. Ueber die Synthese von Cholinestern aux Cholind und Fettsäuren mittels des Dünndarmes. **Erg. Fermentforchung,** 1925, **8,** 229.
2. Abdon (N.-O.) and Uvnas (B.) — **Scand. Arch. Physiol.,** 1937, **1,** 76.
3. Alles (G.-A.) and Hawes (R.-C.). — **J. biol. Chem.,** 1940, **133,** 375.
4. Alles (G.-A) and Hawes (R.-C.). — Cholinesterases. **Sciences,** 1944, **100,** 75.
5. Ammon (R.). — Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. **Arch. f. Physiol.,** 1933, **233,** 486.
6. Ammon (R.) und Kwiatkowski (H.). — Die Bildung von Acetylcholin in Serum und Embrionextrakt. **Arch. f. Physiol.,** 1934, **234,** 269.
7. Armstrong (P.-B.). — The role of the nerves in the action of acetylcholine on the embryonic heart. **Jour. of Physiol.,** 1935, **84,** 20.
8. Arragon (G.) et Sala (E.). — Recherches sur la cholinesterase. Calcul nouveau d'activité enzymatique. **Bul. Soc. Chim. Biol.,** 1948, **1,** 44.
9. Augustinsson (K.-B.). — **Ark. Kemi Miner. Geol.,** 1944, **18 A,** N° 24.
10. Augustinsson (K.-B.). — Choline Estérases. **Nature,** 1945, **156,** 303.
11. Bacq (Z.-M.). — La transmission chimique des influx dans le système nerveux. **Ergeb. der Physiol.,** 1935, **37,** 82.
12. Bacq (Z.-M.). — L'acétylcholine dans les tissus des Invertébrés. **C. R. Soc. Biol.,** 1936, **120,** 243.
13. Bacq (Z.-M.). — Nouvelles observations sur l'acétylcholine et la cholinestérase chez les Invertébrés. **Arch. Intern. Physiol.,** 1937, **44,** 174.
14. Bader (R.), Schutz (F.) and Stacey (M.). — A crystalline serum mucoprotein with high choline-esterase activity. **Nature,** 1944, **154,** 183.
15. Bader (R.), Schutz (F.) and Stacey (M.). — A crystalline serum muco pro tein with high cholinesterase activity. **Nature,** 1945, **155,** 239.
16. Baer (E.). — **J. Biol. Chem.,** 1942, **146,** 391, 7.
17. Barnard (R.-D.). — Cholinergie porphyrin lacrymation and paradoxical mydriasis in the Cat. Possible hoem nature of cholinesterase. **Proc. Soc. exp. Biol. Med.,** 1943, **54,** 254.

18. Barnar (R.-D.). — **Science**, 1946, **104**, 331.
19. Bender (M.-B.). — **Amer. J. Physiol.**, 1939, **126**, 180.
20. Berheim (F. et M.). — The interaction of acetylcholine, epinephrine and certain other drugs on the isolated small intestine of the rat. **Jour. of. Pharm.**, 1934, **51**, 68.
21. Best (J.), Hersley (E.) and Huntzman (F.). — Choline and fat Métabolisme. **J. of Physiol.**, 1935, **83**, 255.
22. Broca (J.). — Le dosage de la cholinestérase comme test de diagnose du serum de Cheval et de son état de conservation. **Thèse Doct. Pharm.**, Toulouse, 1948.
23. Caujolle (F.), Vincent (D.) et Frank (C.). — Action anticholinestérasique des essences végétales. **Comm. Soc. Ph., Toulouse**, Février, 1944.
24. Chang (H.-C.) and Gaddum (J.-H.). — Choline esters in tissue extracts. **Journ. Physiol.**, 1933, **79**, 255.
25. Channon and Wilkinson. — Protéin and the dietary production of fatty liver. **Bioch. Journ.** 1935, **29**, 350.
26. Clark (A.-J.). — **J. Physiol.**, 1927, **64**, 123.
27. Clark et Raventos (J.). — **Quart. J. exp. Physiol.**, 1938, **28**, 155.
28. Cortell (R.), Feldman (J.) and Gellhorm (E.). — Studies on Cholinesterase activity and Acétylcholine content of the central nervous system. **Amer. Jour. of Physiol.**, 1941, **132**, 588.
29. Dale (H.-H.). — The action of certain esters and esters of choline and their relation to muscarine. **Journ. of Pharm.**, 1914, **6**, 147.
30. Dale (H.-H.). — Nomenclature of fibres in the autonomic system and their effects. **Journ. of Physiol.**, 1937, **91**, 4.
31. Dale (H.-H.) and Feldberg (W.). — The chemical transmitter of vagus effect to the stomach. **Jour. of Physiol.**, 1934, **81**, 320.
32. Dale (H.-H.) and Feldberg (W.). — Chemical transmission at motor nerve endings in voluntary muscle. **Journ. of Physiol.**, 1934, **81**, 39 P.
33. Dale (H.-H.) and Feldberg (W.). — The chemical transmitter of nervous stimuli to the sweat glands of the Cat. **Journ. of Physiol.**, 1934, **81**, 40 P.
34. Dale (H.-H.) and Gaddum (J.-H.). - Reactions of denervated voluntary muscle and their bearing on the mode of action of parasympathétic and related nerves. **Journ. of Physiol.**, 1930, **70**, 109.
35. Dale (H.) and Gasser (H.-S.). — The Pharmacology of denervated mammalian muscle. The nature of the substances producing contracture. **Journ. of Pharm.**, 1926, **29**, 53.
36. Danielopolu (D.). — La pathologie de la maladie du sérum des infections et d'autres maladies spécifiques. **Presse médicale**, Avril 1944, **52**, 114
37. Dhellemmes (G.). — Recherches sur la pseudocholinestérase du serum humain. **Thèse Doct. Pharm.**, Lille, 1947.
38. Denys (A.) et Levy (J.). — Détermination de l'activité de la pseudocholinestérase en présence de la cholinestérase spécifique. **C. R. Soc. Biol.**, 1947, **141**, 650 et 731.

39. Dijkstra (C.) et Noyons (A.-K.-M.). — **Arch. Internat. Physiol.**, 1939, **49**, 257.
40. Dudley (H.-W.). Observations on acetylcholine. **Bioch. Journ.**, 1929, **23**, 1064.
41. Easson (L.-H.) and Stedman (E.). — The spécifity of choline-esterase. **Bioch. Journ.**, 1937, **31**, 1723.
42. Eccles (J.-C.). — Synaptic and neuro muscular transmission. **Physiol. Reviews**, 1937, **17**, 538.
43. Engelhart (E.) et Loewi (O.). — **Arch. exp. Path. Pharmakol.**, 1930, **150**, 1.
44. Faber (M.). — Serumcholinesterase in disease. **Acta Med. Scand.**, 1943, **114**, 59 et 72.
45. Feldberg (W.). — Die Wirkung von Histamin und Acétylcholine auf die glatte Muskulatur und ihre Beeinflüssung durch Atropin. **Revue de Pharmacologie**, 1932, **2**, 311.
46. Feldberg (W.) and Gaddum (J.-H.). — The chimical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. **Journ. of Physiol.**, 1934, **81**, 305.
47. Frank (E.). — Die parasympathische Innervation der quergestreiften Muskulatur und ihre klinische Bedeutung. **Klin. Woch.**, 1920, **31**, 725.
48. Frank (E.), Nothmann (N.) und Hirsch-Kauffmann (N). — Uber die « tönische » Kontraction des quergestreiften Säugetiermuskels nach Ausschaltung der motorischen Nerven. Untersuchungen an der Musculatur der Extremitaten. **Arch. f. Physiol.**, 1923, **198**, 391.
49. Frommel (E.), Herschberg (A.-D) et Piquet (J.). — Effet des ions inorganiques sur l'activité de la cholinestérase sérique. I. Etudes **in vitro** sur le sérum de Cheval. **Helv. Physiol. Acta**, 1944, **2**, 169.
50. Frommel (E.), Herschberg (A.-D.) et Piquet (J.). — Effet des ions inorganiques sur l'activité de la cholinestérase sérique. II. Etudes **in vivo** sur le Cobaye. **Helv. Physiol. Acta**, 1944, **2**, 193.
51. Führer (H.). — Die quantitative Bestimmung des Cholins auf biologischem Wege. **Bioch. Ztsch.**, 1916, **77**, 408.
52. Führer (H.). — Untersuchungen über den Synergismus von Giften. Die chemische Erregbarkeitsteigerungen glatter Musculatur. **Arch. f. exp. Path.**, 1918, **82**, 51.
53. Gautrelet (J.). — La choline, son rôle hypotenseur dans l'organisme. Contribution à l'étude des coordinations fonctionnelles.
54. Gautrelet (J.). — Contribution à l'étude de la choline dans la série animale. **Congrès int. de Physiol.**, Vienne, 1910.
55. Gautrelet (J). — La choline et l'adrénaline dans l'organisme. Leur rôle dans la transmission humorale de l'excitation nerveuse limitée aux Vertébrés. **Bull. Acad. Méd.**, 1935, **113**, 238.
56. Gautrelet (J.). — Contribution à l'étude de la choline dans l'organisme animal. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 1936, **18**, 449.
57. Gautrelet (J.) et Halpern (N.). — Antagonisme du curare, du cyanure d'éthyle et de l'hémolymphe vis à vis de l'action inhibitrice de l'acétylcholine sur le cœur d'**Helix Pomatia**. Influence de l'ésérine. **C. R. Soc. Biol.**, 1935, **118**, 412.

58. Glasson (B.) et Mutrux (S.). — Etude des cholinestérases du sang et du liquide céphalo-rachidien dans différents syndromes psychiâtriques. **Presse Médicale,** 1947, **20,** 230.

59. Glick (D.). — Propertie of Choline esterase in human serum. **Bioch. Journ.,** 1937, **31,** 521.

60. Glick (D.), Graubach (S.) et Moore (D.-H.). — Acholesterase activities of electro phoretically separated protéins of serum. **J. Biol. Chem.,** 1942, **144,** 525.

61. Güggenheim (M.) un Lœffler (W.). — Uber das Vorkommen und Schicksal des Cholins im Tie körper. **Bioch. Ztsch.,** 1916, **14,** 209.

62. Gunter (J.-M-). — Absence of pseudocholinesterase from the tissues of Ruminants. **Nature,** 1946, **157,** 369.

63. Hall (G.-E.) et Lucas (C.-C.). — **J. Pharmacol.,** 1937, **59,** 34.

64. Hall (G.-E.) et Lucas (C.-C.). — The acetylcholine-cholinesterase system. **J. Pharmacol.,** 1937, **61,** 10.

65. Halpern (N.) et Corteggiani (E.). — Etude comparative de la destruction de l'acétylcholine par divers organes de Cobaye, de Grenouille et d'Escargot. **C. R. Soc. Biol.,** 1935, **119,** 1049.

66. Hawkins (R.-D.) et Gunter (J.-M.). — **Biochem. J.,** 1946, **40,** 192.

67. Herschberg (A.-D.). — Contribution à l'étude de la régulation physiologique du système acetylcholine-cholinesterase. **Thèse Doct. Sc. Paris,** 1946.

68. Hunt (C.-C.) et Taveau (M.). — **Brit. Med. J.,** 1906, **2,** 1788.

69. Jullien (A.), Vincent (D.), Bouchet (M.) et Vuillet (M.) — Nouvelles observations relatives aux actions et antagonismes de quelques substances pharmaco-dynamiques sur le cœur d'**Helix Pomatia. Soc. Biol. Lyon,** Juillet, 1936.

69 bis. Jullien (A.), Vincent (D.), Boucher (M.) et Vuillet (M.). — Contribution à l'étude de l'action des extraits cardiaques sur l'automatisme du cœur chez les Mollusques. **Journ. Physiol. et Path. Gen.,** 1938.

70. Kahane (E.). — Le sel de Reinecke. **Journ. Pharm. et Chim.,** 1935, **8,** 22, 254.

70 bis. Kahane (E.) et Coupechoux (R.). — Dosage brométrique des sulfocyanures. Application à la microanalyse et à l'analyse des Reineckates. **Bull. Soc. Chim. France,** 1936, 5e série, **3,** 1588.

71. Kahane (E.) et Kahane (M.) — Sur l'hydrolyse de l'acétylcholine. **Bull. Soc. Chim. de France,** 1948, **14,** 1212.

72. Kahane (E.) et Levy (J.). — Caractérisation et dosage de l'acétylcholine dans les substances biologiques. **Bull. Soc. Chim. Biol.,** 1936, **18,** 565.

72 bis. Kahane (E.) et Levy (J.). — Action du sang sur quelques ammoniums quaternaires à fonction ester. **Bull. Soc. Chim. Biol.,** 1936, **18,** 529.

73. Kahane (E.) et Levy (J.). — Sur la présence à l'état dissimulé d'une substance acétylcholinique dans le sang normal. **C. R. Ac. Sc.,** 1936, **202,** 1210.

74. Kahlson (G.). — Nachweis und Vorkommen des präformierten Acetylcholins in Blut und Geweben. **Arch. F. Exp. Path.,** 1934, **175,** 198.

75. Kapfhammer (J.) und Bischoff (C.). — Acetylcholin und cholin aus Tierischen Organen. **Ztsch. Physiol. Chem.**, 1930, **191**, 169.
76. Kaswin (A.). — Action inhibitrice des ammoniums quaternaires sur l'activité de la cholinestérase du sérum sanguin. **C. R. Soc. Biol.**, 1938, **127**
77. Koshtoyantz (C.-S.). — De la cholinestérase chez les Invertébrés. **Ukrainian Bioch. Journ.**, 1936, **9**, 665.
78. Koshtoyantz (C.-S.). — Du mode d'action de l'acétylcholine révélé par un nouvel indicateur biologique et de la cholinesterase chez les Invertébrés. **Bull. Biol. Med. Exp. URSS**, 1936, **2**, 34.
79. Langemann (H.). — Neter das Vorkommen Verschiedenen cholinesterase. Typen in meuschlichen Organen. **Helv. Physiol. Pharmacol. Acta**, 1944, **2**, C 17.
79bis. Langemann (R.). — Weitere Untersuchungen über das Vorkommen der Cholinesterase und der Mono aminoxydase in menschlichen Organen. **Helv. Physiol. Pharmacol. Acta**, 1944, **2**, 367.
81. Levy (J.) et Olszycka (L.). — Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. Technique de dosage biologique de l'acétylcholine. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 1936, **18**, 490.
82. Lœwi (O.). — The ferrier lecture on Problems connected with the principle of humoral transmission of nervous impulse. **Pros. Roy. Soc. B.**, 1935, **118**, 299.
83. Lœwi (O.). — Uber humorale Ubertragbarkeit der Herznervenwirkung. **Arch. f. Physiol.**, 1921, **189**, 239; 1922, **193**, 200.
84. Lœwi (O.). — Uber eine Wasserunlösliche Zustandsform des Acetylcholins im Zentralnervensystem. **Naturwissenschaften**, 1937, 461.
85. Lœwi (O.) et Hellauer (H.). — The acetylcholine content of the nerves of warm blooded animals. **Journ. of Physiol.**, 1938, **93**, Proceed. 34 P.
86. Lœwi (O.) und Navratil (S.). — Uber humorale übertragba keit der Herznervenwirkung; über das Schicksal des Vagusstoffes. **Arch. f. Physiol.**, 1926, **214**, 678.
87. Lœwi (O.) und Navratil (S.). — Uber den Mechanismus der vaguswirkung von Physostigmin und ergotamin. **Arch. f. Phys.**, 1926, **214**, 689.
88. Major (R.) and Clin (J.). — **Jour. Amer. Chem. Soc.**, 1932 **52**, 242.
88 bis. Major (R.) and Cline (J.). — **Jour. Pharm. exp. Ther.**, 1935, **54**, 131.
89. Marnay (A.). — Cholinestérase dans le pancréas et la rate de quelques Mammifères. **C. R. Soc. Biol.**, 1938, **128**, 519.
90. Marnay (A.). — Cholinestérase dans le muscle strié de Crapeau. **C. R. Soc. Biol.**, 1938, **128**, 290.
91. Massart (L.) et Dufait (R.). — **Enzymologia**, 1939, **6**, 282; **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 1939, **21**, 1039.
92. Massart (L.) et Dufait (R.). — **Nature**, 1946, **145**, 822.
93. Matthes (K.). — The action of blood on acetylcholine. **J. Physiol.**, 1930, **70**, 338.

94. Maxime (M.) et Vasiliu (C.). — Sur la teneur en choline du sang à différents niveaux, **Bull. Soc. Chim. Biol.**, 1929, **11**, 70.

95. Mazur (A.) et Bodansky (O.). — The Mechanism of in vitro and in vivo inhibition of Cholinesterase activity by diiso propyl-fluorophosphate. **J. Biol. Chem.**, 1946, **163**, 261.

96. Minz (B.). — Pharmakologische Untersuchungen am Blutegel-präparat; zugleich eine Methode zum biologischen Nachweiss von Acetylcholin bei Anwesenheit enderer Pharmakologische-wirksamer körpereigener Stoffe. **Arch. f. exp. Path.**, 1932, **168**, 292.

97. Mendel (B.) and Mundell (D.-B.). — Studies on cholinesterase. A method for purification of a pseudo cholinesterase from dog pancreas. **Biochem. J.**, 1943, **37**, 64.

98. Mendel (B.), Mundell (D.-B.) and Rudney (H.). — Studies an cholinesterase: specific tests for true and pseudocholinesterase. **Biochem. J.**, 1943, **37**, 473.

99. Mendel (B.) and Rudney (H.). — Studies an cholinesterase: cholinesterase and pseudocholinesterase. **Biochem. J.**, 1943, **37**, 59.

100. Morand (P.) et Laborit (H.). — Un nouvel examen biologique. La recherche de l'activité cholinestérasique et ses conséquences en clinique. **Presse Médicale**, 1946, **106**.

101. Mundell (D.-B.) and Rudney (H.). — Plasma cholinesterase in male and female rats. **Nature**, 1944, **153**, 557.

102. Nachmansohn (D.). — La transmission de l'influx nerveux dans le système nerveux central. **C. R. Soc. Biol.**, 1937, **126**, 783.

103. Nachmansohn (D.). — Distribution de la cholinestérase dans le cerveau humain. **C. R. Soc. Biol.**, 1938, **128**, 24.

104. Nachmansohn (D.) et Lederer (E.). — **C. R. Soc. Biol.**, 1939, **130**, 321.

104 bis. Nachmansohn (D.) et Lederer (E.). — Sur la biochimie de la cholinestérase. **Bull. Soc. Ch. biol.**, 1939, **27**, 797.

105. Nachmansohn (D.) et Machado (A.-L.). — The formation of acetylcholine. A new enzyme: choline-acetylase. **J. Neurophysiol.**, 1943, **6**, 397.

106. Nachmansohn et Rothenberg (M.-A.). — **J. Biol. Chem.**, 1945, **158**, 653; **Science**, 1944, **100**, 454.

107. Oury (A.) et Bacq (Z.-M.). — Ester instable de la choline sans cholinestérase dans la pomme de terre et un champignon. **Arch. Int. Physiol.**, 1938, **47**, 92.

108. Paget (M.). — Questionnaire du praticien. **Annales Biol. Clin.**, 1947, **5**, 431.

109. Plattner (F.). — **Pflügers Arch. ges. Physiol.**, 1926, **214**, 112.

110. Plattner (F.). — **Pflügers Arch. ges. Physiol.**, 1928, **218**, 488, 506; 219, 181, 678, 686; 220, 180, 606.

111. Plattner (F.) und Galehr (O.). — Uber das Schicksal des Acetylcholins im Blut. VI. Der Einfluss verschiedener Nakotoca auf die Spaltung des Acetylcholins. **Arch. f. Physiol.**, 1928, **220**, 606.

112. Plattner (F.) und Hintner (H.). — Die Spaltung von Acetylcholin durch Organextrakte und Körperflüssigkeiten. **Arch. f. Physiol.**, 1930, **225**, 19.

113. Plattner (F.) und Tsudzimura (H.). — Acetylcholin und Cholin in Organextrakten. **Arch. f. Physiol.**, 1935, **236**, 173.

114. Renshaw (R.-K.) and Bacon (N.). — The basis for the physiological activity of onium compounds. VI. Rates of hydrolyses of certain esters of choline and its analogs. **J. Ame. Chem. Soc.**, 1926, **48**, 1726.

115. Richter (D.) and Croft (P.-G.). — Blood Esterases, **Biochem. J.**, 1942, **36**, 746; **J. Physiol.**, 1943, **101**, 9 P.

116. Rœpke (M.-H.). — **J. Pharmacol.**, 1937, **59**, 264.

117. Roman. — Eine chemische Methode zur Quantitativen Bestimmung des Cholins. **Bioch. Zeitschr.**, 1930, **219**, 218.

118. Sawyer (C.-H.). — Cholinesterase and the behavior problem in amblyostoma. II. The effects of inhibiting Cholinesterase. **Science**, 1945, **101**, 385.

119. Sharpe (S.). — A method for quantitative estimation of choline im blood. **Bioch. Journ. L.**, 1923, **17**, 41.

120. Simonart (A.). — Contribution à l'étude des propriétés pharmacologiques des dérivés de la choline. **Revue Belge des Sciences Médicales**, 1933, **5**, 73; **Journ. Pharmacol.**, 1932, **46**, 157.

121. Stedman (E.) and Stedman (E.). — **Biochem. J.**, 1935, **29**, 2107 et 2563.

121 bis Stedman (E.) and Stedman (E.). — The mecanisme of the biological synthesis of acetylcholin. I. The isolation of acetylcholin produced by brain tissue in vitro. **Bioch. Journ.**, 1937, **31**, 817.

122. Stedman (E.), Stedman (E.) and Easson (L.-H.). — Choline-esterase, an enzyme présent in the blood serum of the horse. **Biochem. J.**, 1932, **26**, 2056.

123. Stedman (E.), Stedman (E.) and White (A.-C.). — A comparison of cholinesterase activites of the blood sera from various species. **Biochem.**, 1933, **27**, 1055.

124. Teissier (J.) et Morel (A.). — Résultat de la recherche de la choline dans le sang des sujets hypotendus. **Lyon Médical**, 1909, **113**, 916.

125. Tücker et Eckstein. — The effect of supplementary méthionine and cystine on the production of fatte livers by dict. **Journ. Biol. Chem.**, 1937, **121**, 479.

125 bis. Tücker and Eckstein. — The effect of supplementary lysine, methionine, and cystine on the production of fatty livers by fat diets containing gliadin. **Journ. Biol. Chem.**, 1938, **126**, 118.

126. Vahlquist (B.). — **Scand. Arch. Physiol.**, 1935, **72**, 133.

127. Vertiainen (A.). — The sensitization of leech muscle to barium by eserine. **Journ. of Physiol.**, 1933, **80**, 21 P.

128. Du Vigneaud, Glen, Kilmer, Rachelle and Cohn. — On the mecanisme of the conversion in vivo of methionine to cystine. **Journ. Biol. Chem.**, 1945, **155**, 645.

129. Villaret (M.), Justin-Besançon et Cachera. — Recherches expérimentales sur quelques esters de la choline. **Paris, Masson, 1934.**

130. Villaret (M.)., Justin-Besançon, Cachera et Said. — Recherches

préliminaires concernant l'action de la méthylacétylcholine chez les sujets normaux. **Annales de Médecine,** 1939, **32,** 385.

131. Vincent (D.). — Dosage de l'acétylcholine et de la choline dans les tissus Cobayes après injection de fortes doses de chlorure d'acétylcholine. **Soc. Biol. Lyon,** Oct. 1938.

132. Vincent (D.). — L'acétylcholine et son rôle dans l'organisme animal. **Thèse Doct. Sc. Lyon,** 1938.

133. Vincent (D.) et Beaujard (P.). — Recherches sur les inhibiteurs de la cholinestérase. **Bull. Soc. Chim. Biol.,** 1943, **25,** 1358.

134. Vincent (D.) et Broca (J). — Méthode de diagnose du sérum de cheval par titration cholinestérasique. **Ann. Pharm. Franç.,** 1946, **4,** 187.

135. Vincent (D.) et Jullien (A.). — Recherches sur les esters de la choline chez les Mollusques. Esters de la choline du myocarde. Activité cholinestérasique du myocarde et de l'hémolymphe. **Journ. Physiol. et Path. Gen.,** 1939, **37,** 35.

136. Vincent (D.) et Maugein (A.). — Dosage biochimique de l'ésérine par mesure de son action anticholinestérasique. (Application en matière médicale et en pharmacie). **Bull. Sc. Pharm.,** 1942, **49,** 141.

137. Vincent (D.) et De Prat (J.). — Recherches préliminaires sur la cholinestérase du sérum dans les syndrômes d'insuffisance hépatique. **C. R. Soc. Biol.,** 1942, **136,** 821.

138. Vincent (D.), Segonzac (G.) et De Prat (J.). — La cholinestérase du sérum, son dosage, intérêt clinique de son étude. **Ann. Biol. Clinique,** 1934, **2,** 35.

139. Vincent (D.) et Sero (I). — Recherches biochimiques et pharmacodynamiques sur **Tabernanthe Iboga Baillon. Bull. Soc. Chim. Biol.,** 1942, **24,** 1352.

140. Webster (M.-D.). — The quantitative action of acetylcholine and histamin on the guinea pig utérus. **Journ. of. Physiol.,** 1935, **53,** 340.

141. Zeller (E.-A.) und Bisseger (A.). — Uber die Cholinesterase des Gehirns und der Erythrocyten. **Helvetica Chim. Acta,** 1943, **26,** 1619.

IMP. FORESTIÉ, 23, RUE DE LA RÉPUBLIQUE. — MONTAUBAN

Questions posées par la Faculté :

1) *Toxicologie des benzols.*

2° *Facteurs hormonaux et vitaminiques de l'hémoporèse.*

3° *Rôle du bore dans la fécondation végétale.*